

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA

UNIDAD DE POSTGRADO

**Estudio fitoquímico de la corteza de la raíz de
Aspidosperma desmanthum Benth. Ex Mull. Arg. Con
actividad antiplasmodial**

TESIS

para optar el Grado Académico de Magíster en Química con Mención en
Química Orgánica

AUTOR

Frida Enriqueta Sosa Amay

ASESOR

Fred García Alayo

Lastenia Ruiz Mesía

Lima – Perú

2001

DEDICATORIA

A **Dios Padre** por que de El es mi vida y todo conocimiento proviene de El. A **Jesús** quién con su infinito amor sostiene mi vida y al **Espíritu Santo** que me da el entendimiento y la sabiduría.

A la memoria de mis padres **Oscar Ezequiel** y **Frida** porque su esfuerzo no fue vano y dejaron en mi, enseñanzas de vida y con ellos aprendí a superar las dificultades y debilidades.

A mi esposo **Carlos**, por quien llegué a la amazonia a este maravilloso paraje loreto de exhuberancia y espesura donde la humanidad ha puesto sus expectativas.

A mi hija **Rosa Amelia** por que cambió mi existencia llenándola de alegría, con ella cada día aprendo a enfrentar los avatares de la vida.

AGRADECIMIENTO

Al Laboratorio de Investigación de Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonia Peruana de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (LIPNAA-UNAP); lugar donde se realizó la parte experimental de la tesis.

Al Instituto de Productos Naturales y Agro Biología de Canarias (IPNA – CSIC). Tenerife, España, en la persona del Sr. Matias Reina Artiles Ph. D.; por permitir el uso de los equipos de RMN ^{13}C y ^1H , espectrómetro de masas entre otros para la toma de los espectros.

Al Proyecto de Acción Potenciadora (PAP), al Proyecto Ibero Americano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED) y al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología del Perú (CONCYTEC), por el apoyo financiero para la ejecución de esta tesis.

Al Programa de Investigación para el Aprovechamiento Sostenible de la Biodiversidad. Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana (IIAP); por el apoyo financiero.

Al Instituto Fármaco Bioquímica de la Universidad Mayor de San Andrés, La Paz Bolivia; donde me entrené en la evaluación de la actividad biológica.

A la Ing. **Lastenia Ruiz Mesia** Dra y al Ing. **Wilfredo Ruiz Mesia** Dr.; por su invalorable dirección y enseñanzas en el desarrollo de esta tesis.

Al Ing. **Gabriel Vargas Arana** Dr. y a la Blgo. **Elsa Rengifo Salgado**; por su apoyo científico y financiero.

A la memoria de un gran amigo y maestro Ing. **Grimaldo Garcia Garay** Ms.C por sus enseñanzas y apoyo incondicional.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | |
| INTRODUCCIÓN | 01 |
| OBJETIVOS | 03 |
| | |
| CAPÍTULO I | |
| MARCO TEÓRICO | 04 |
| 1 ALCALOIDES | 04 |
| 1.1 Síntesis y Localización de los Alkaloides | 04 |
| 1.2 Alkaloides Indólicos | 06 |
| 1.2.1 Alkaloides Indólicos del Género <i>Aspidosperma</i> | 16 |
| 2. INFORMACIÓN BOTANICA | 16 |
| 2.1. Familia Apocynaceae. | 16 |
| 2.2 Genero <i>Aspidosperma</i> Mart. & Zucc | 17 |
| 2.3 Clasificación y Descripción Botánica de la Especie: <i>A. desmantum Benth. Ex Mull. Arg.</i> | 17 |
| 2.4 Ubicación geográfica del género <i>Aspidosperma</i> | 19 |
| 3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ALCALOIDES | 20 |
| 3.1 Estudios Biológicos del Género <i>Aspidosperma</i> | 20 |
| 3.2 Fármacos Antimaláricos Tradicionales. | 21 |
| 3.2.1 Clasificación de los Principales Fármacos Antipalúdicos Clásicos | 21 |
| 3.2.2 Actividad Antimalárica de los Fármacos Clásicos | 21 |
| 3.2.3 Mecanismo de Acción de los Fármacos Antimaláricos | 22 |
| 3.2.4 Resistencia y Nuevas Perspectivas de Antimaláricos | 23 |
| 4. TÉCNICAS ANTIMALÁRICAS <i>in vitro</i> | 23 |
| 4.1 Evaluación de la actividad Antimalárica <i>in vitro</i> | 24 |
| 4.1.1 Congelación y Descongelación de <i>Plasmodium falciparum</i> | 24 |
| 4.1.2 Método Visual para determinar la Actividad Antimalárica <i>in vitro</i> de Productos Naturales y/o Síntesis | 25 |
| 4.2. Evaluación de la Actividad Antimalárica <i>in vitro</i> Mediante FBIT | 25 |

CAPÍTULO II

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | MATERIALES Y MÉTODOS | 26 |
| 1.1 | Material Botánico | 26 |
| 1.2 | Material de Laboratorio y otros | 26 |
| 1.3 | Solventes Orgánicos y Reactivos | 27 |
| 1.3.1 | Adsorbentes | 27 |
| 1.4 | Equipos | 27 |
| 2 | TÉCNICAS INSTRUMENTALES | 28 |
| 2.1 | Resonancia magnética nuclear | 28 |
| 2.2 | Espectrometría de Masas (EM) | 29 |
| 2.3 | Espectroscopia de Infrarrojo (IR) | 29 |
| 2.4 | Espectroscopia de Ultravioleta (UV) | 29 |
| 2.5 | Actividad Óptica. | 29 |
| 2.6 | Punto de Fusión (PF) | 29 |
| 2.7 | Técnicas Cromatográficas | 29 |
| 2.7.1 | Cromatografía de Columnas (CC) | 29 |
| 2.7.2 | Cromatografía en Capa Fina (CCF) | 30 |
| 2.7.3 | Cromatografía en Capa Gruesa Preparativa (CCGP) | 30 |
| 3 | PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL | 30 |
| 3.1 | Preparación de las Muestras | 30 |
| 3.2 | Extracción de Alcaloides de la Corteza de Raíz de <i>A. desmanthum</i> | 30 |
| 3.3 | Fraccionamiento Cromatográfico del Extracto Alcaloidal Ácido de la Corteza de Raíz de <i>A. desmanthum</i> . | 31 |
| 3.3.1 | Aislamiento y Purificación de las Fracciones Alcaloidales Obtenidas del Extracto Alcaloidal Ácido de la Corteza de Raíz de <i>A. desmanthum</i> . | 32 |
| 3.4 | Fraccionamiento Cromatográfico del Extracto Alcaloidal Básico de la Corteza de Raíz de <i>A. desmanthum</i> | 36 |
| 3.4.1 | Aislamiento y Purificación de las Fracciones Alcaloidales Obtenidas del Extracto Alcaloidal Básico de la Corteza de Raíz de <i>A. desmanthum</i> | 37 |
| 3.5 | Datos Físicos y Espectroscópicos de los Alcaloides Aislados | 38 |
| 3.5.1 | Aspidolimina (1) | 38 |
| 3.5.2 | Aspidocarpina (2) | 39 |

INTRODUCCIÓN

La malaria ocupa el tercer lugar en importancia a nivel mundial, por su elevada morbilidad y mortalidad. Es la principal enfermedad parasitaria debilitante, no controlable por vacuna, de zonas tropicales y subtropicales, donde un 40% de la población mundial vive en riesgo potencial de infectarse con alguna especie de *Plasmodium*. Se reportan entre 300 y 500 millones de casos de malaria anuales, siendo el *P. falciparum* el más patógeno causante del 80 % de los casos y del 90% de las muertes. Y el *P. vivax* al cual se deben la mayor cantidad de casos en el Perú,^{1,2,3} donde desde 1989 se manifestó una tendencia ascendente culminando en 1998 durante el fenómeno del Niño con 280 000 casos confirmados de malaria⁴ y en los cuatro últimos años se han reportado en promedio 2180 casos de malaria grave, correspondiendo el 70% a Loreto; donde en 1991 ingresó el *P. falciparum* por el Putumayo y el Río Blanco. En 1993 ingresa el *Anopheles darlingi* (vector principal en la selva), registrándose en todo el territorio nacional 67 especies de anofelinos.^{3,4} Para el 2006 el índice del riesgo por enfermar de malaria fue de 48.09 (que nos ubica en la zona de seguridad).⁵

El control de la malaria sigue siendo fundamentalmente químico, realizándose rociamiento de insecticidas de acción residual en criaderos focalizados y viviendas en zonas de riesgo; pero los esquemas terapéuticos son la base principal para combatir la malaria. La elevada fármaco resistencia desarrollada por el *Plasmodium*, supera la capacidad para poner una nueva molécula en el mercado; esto ha obligado a que en 8 de los 9 países amazónicos, para tratar el paludismo por *P. falciparum* se use artesunato y mefloquina; pero en el Perú además se conserva el esquema tradicional sulfadoxina-pirimetamina más artesunato para la costa norte.^{5,6} El alcaloide quinina que por 400 años sigue siendo el fármaco de elección en malaria grave o severa. Todo esto obliga a que se monitorice la resistencia a insecticidas y antimaláricos.^{7,8} Por otro lado se trabaja en la creación de una vacuna en base a la región menos cambiante del ADN del *Plasmodium* que es altamente mutagenicidad.⁹

Los alcaloides son uno de los grupos de metabolitos secundarios de gran diversidad estructural, generalmente de carácter básico. En su mayoría son de origen vegetal y algunos pocos de origen animal; que suelen tener actividad biológica incluso en dosis muy bajas. La familia Apocynaceae comprende 250 a 550 géneros que agrupa 3700 a

5100 especies ricas en alcaloides indólicos y muchas de ellas reportadas como antimaláricos por las diferentes etnias amazónicas¹⁰ y de algunas se han aislados alcaloides verificándose su variado efecto antimicrobiano, reportado en la literatura científica; por lo que su investigación resulta atractiva.

Los antimaláricos actuales son producto de la investigación extranjera en países donde la malaria fue superada y sus líneas de investigación se dirigen a otros campos, por ello el *Laboratorio de Investigación de Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonia (LIPNAA)* de la *Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP)* ubicado en una zona endémica de malaria, ha establecido una línea de investigación para la búsqueda, obtención y validación de nuevos agentes antimaláricos; en base a información etnobotánica de la selva amazónica que alberga las 2/3 partes de la biodiversidad del mundo. En el Perú existen 84 de las 117 zonas de vida del mundo y se tienen reportadas en el LIPNAA 170 especies de uso antimalarico por las etnias.^{11, 12}

En el presente trabajo de investigación se presentan los resultados correspondientes al estudio fitoquímico de la corteza de raíz de la especie amazónica *Aspidosperma desmanthum* Benth. ex Müll. Arg. de la familia Apocynaceae, de uso tradicional como antimalárico.

OBJETIVOS:

Objetivo General

Caracterizar químicamente la corteza de raíz de la *Aspidosperma desmanthum* Benth. ex Müll. Arg.

Objetivos Específicos

- Fraccionar los extractos alcaloidales mediante técnicas cromatográficas.
- Aislar y purificar los compuestos químicos presentes en la *Aspidosperma desmanthum* Benth. ex Müll. Arg.
- Determinar la estructura química de los compuestos aislados, mediante el análisis de las técnicas espectroscópicas de IR, EM, RMN ^1H y RMN ^{13}C .
- Identificar los alcaloides aislados por interpretación de los datos físicos y espectroscópicos.
- Evaluar la actividad antimalárica de los compuestos mayoritarios aislados frente a *P. falciparum* y mediante el test de la ferroprotoporfirina IX (FBIT).

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1 ALCALOIDES

Los alcaloides son compuestos orgánicos por lo general de carácter básico que representan una de las familias más numerosas y diversas de metabolitos secundarios; en su mayoría de origen vegetal, algunos pocos de origen animal y microbiano; presentan gran actividad biológica aún a dosis muy bajas, por lo que su investigación resulta atractiva. No existe una definición de los alcaloides, que abarque a todos de forma generalmente aceptada dada su variada y compleja estructura; que no permite agruparlos en base a un origen biogenético común^{13, 14, 15}. En general presentan una estructura heterocíclica integrada por la presencia de uno o más átomos de nitrógeno que forma parte en su gran mayoría de una amina terciaria, pocos alcaloides de constitución sencilla (putrescina, tiramina) presentan una amina primaria, algunos poseen aminas secundarias y muy rara vez se encuentran formando parte de una amina cuaternaria como en los alcaloides de la colina y betaina.^{15,16}

1.1 SÍNTESIS Y LOCALIZACIÓN DE LOS ALCALOIDES

La microquímica revela que los alcaloides se localizan en tejidos periféricos como raíces, cortezas, hojas y tegumentos de semillas, se encuentran en estado libre, glicosidados,^{16, 17} solubles como sales (citratos, malatos, tartratos, meconatos, isobutiratos y benzoatos) o en combinación con taninos. La basicidad y las acciones antimetabólicas de la mayoría de éstas moléculas condicionan su almacenamiento en vacuolas de tipo específicas (lactíferas) o inespecíficas.¹⁴

La biosíntesis se da en tejidos de franco desarrollo (raíz en crecimiento, células especializadas de los lactíferos, cloroplastos). Los alcaloides de acuerdo a su origen biogenética se clasifican en 4 grupos: los que proceden de un aminoácido: ornitina/arginina, lisina, fenilalanina/tirosina, triptófano, histidina, ácido antranílico y ácido nicotínico; los alcaloides purínicos, terpenos aminados y poliacétidos^{15, 18}

A la fecha se han aislado alrededor de 26 900 alcaloides aislados de plantas, hongos, organismos marinos y mamíferos; de 186 familias de plantas que agrupan hasta el momento 11 354 géneros y 208 066 especies conocidas, solo se han estudiado 7231

especies pertenecientes a 1730 géneros (14.2%) aislándose un total de 21120 alcaloides.¹⁹

En el grupo de las dicotiledóneas 20 son las familias más ricas entre ellas: Apocynaceae, Rutaceae, Ranunculaceae, Fabaceae, Papaveraceae, Menispermaceae, Annonaceae, Solanaceae, Asteraceae etc. con aproximadamente 19 449 alcaloides aislados, los cuales se clasifican por su estructura en 1872 tipos de alcaloides; de los cuales 539 son de tipo indólico siendo la familia Apocynaceae la más representativa con 2664 alcaloides aislados de 1700 especies estudiadas.¹⁹

En las monocotiledonias se han aislado 1774 alcaloides identificándose 258 tipos de estructuras alcaloidales y en las gimnospermas se aislaron 275 alcaloides agrupados en 43 tipos estructurales.¹⁹

En 35 familias botánicas que agrupan 693 géneros y 14 671 especies se han detectado alcaloides, que aún no han sido aislados o están en proceso de identificación.¹⁹

La formación del sistema heterocíclico requiere de un proceso inter o intramolecular simple: formación de una base de Schiff o, frecuentemente la reacción de Mannich. Esta formación de un alcaloide, puede necesitar de la intervención de una, dos o más moléculas de uno solo o diferentes aminoácidos. En el caso particular de los alcaloides terpénicos, los precursores poseen un origen estrictamente terpénico y la aminación de la molécula es tardía.¹⁵

Su concentración en las plantas va desde ppm como en la Vinca de Madagascar (*Catharanthus roseus*) 3g de vinblastina a partir de 1 tonelada de hojas, hasta un 15% en corteza del tronco de la quina (*Cinchona ledgeriana*) y su contenido es desigual en los diferentes órganos de la planta, pudiendo algunas partes carecer de ellos; además de variar con el período de desarrollo de la misma, la estación y las condiciones medio ambientales.^{15,16}

La función que cumplen los alcaloides en la planta no está determinada; pero se conoce que aproximadamente el 80% de ellas no contienen estos metabolitos secundarios¹⁵, por lo tanto no son vitales para los organismos vivos¹⁷. Se cree que podrían intervenir protegiendo a las plantas de los depredadores (si se admite que la diversidad

estructurales es el reflejo de la adaptación constante), otras teorías proponen que se trataría de: metabolitos terminales, productos intermediarios, sustancias de reserva o reguladores del crecimiento; lo único cierto es su amplia utilidad terapéutica.^{15, 19}

Un resumen del origen biosintético de los diferentes alcaloides en la (Fig. 1)

1.2 ALCALOIDES INDÓLICOS

Los alcaloides indólicos, comprende un grupo amplio de compuestos de gran diversidad estructural y sólo de algunos de ellos se conoce su efecto fisiológico; son los alcaloides monoterpénicos o indolterpénicos (AMIs) los más importantes y los más extensamente estudiados; estos derivan biogénicamente de un único precursor, formado por condensación aldólica del aminoácido triptófano con el monoterpene secologanina. Estos alcaloides han sido clasificados en nueve grupos: estrichano, corinanteano, vallesiacotamano, vincosano, aspidoespermato, plumerano, eburnano, ibogano y tacamano, que derivan de los esqueletos fundamentales I (Aspidoesperma), II (Corinante) y III (Iboga)²⁰ (Fig. 02).

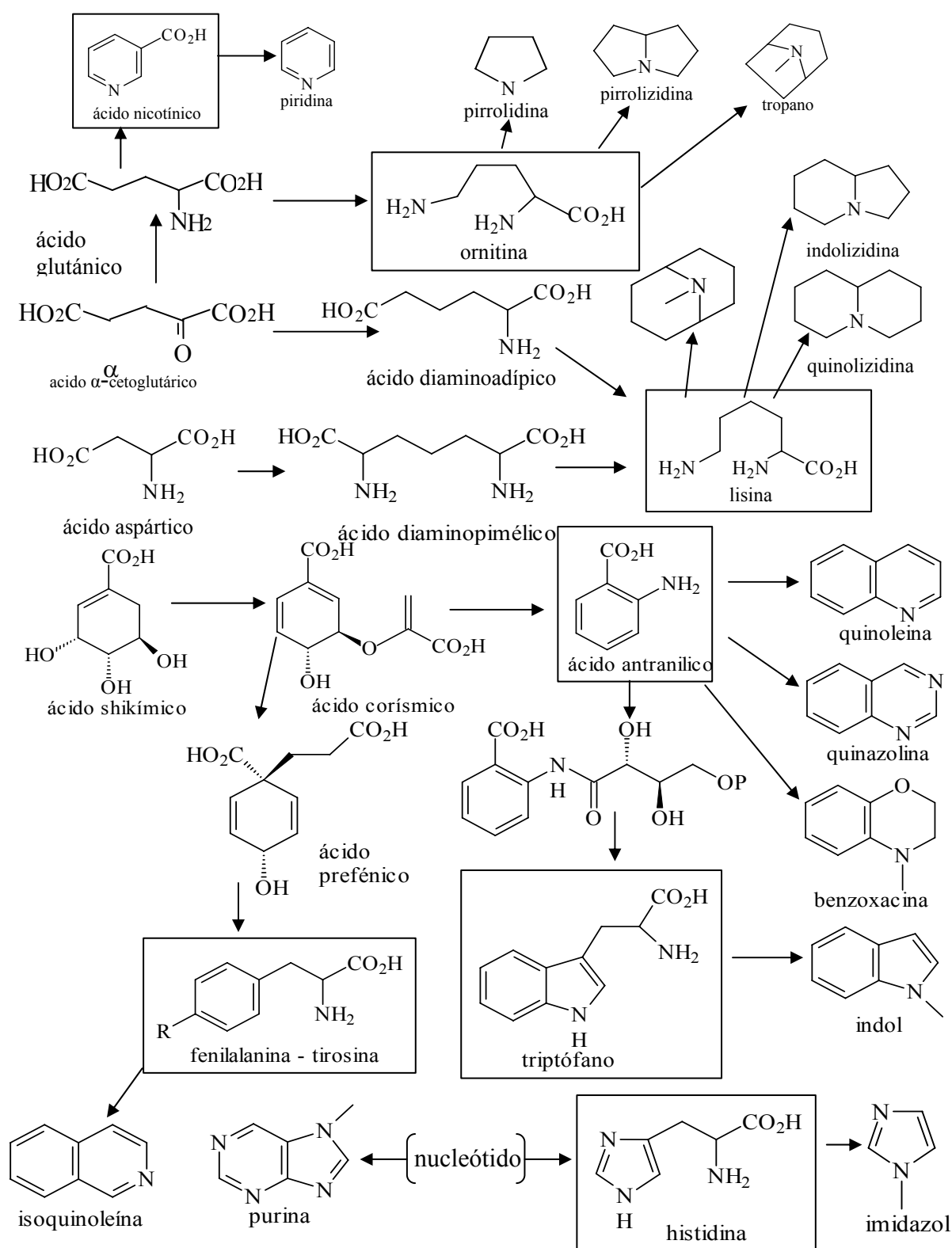


Figura 1. Origen biosintético de los diferentes alcaloides ¹⁴

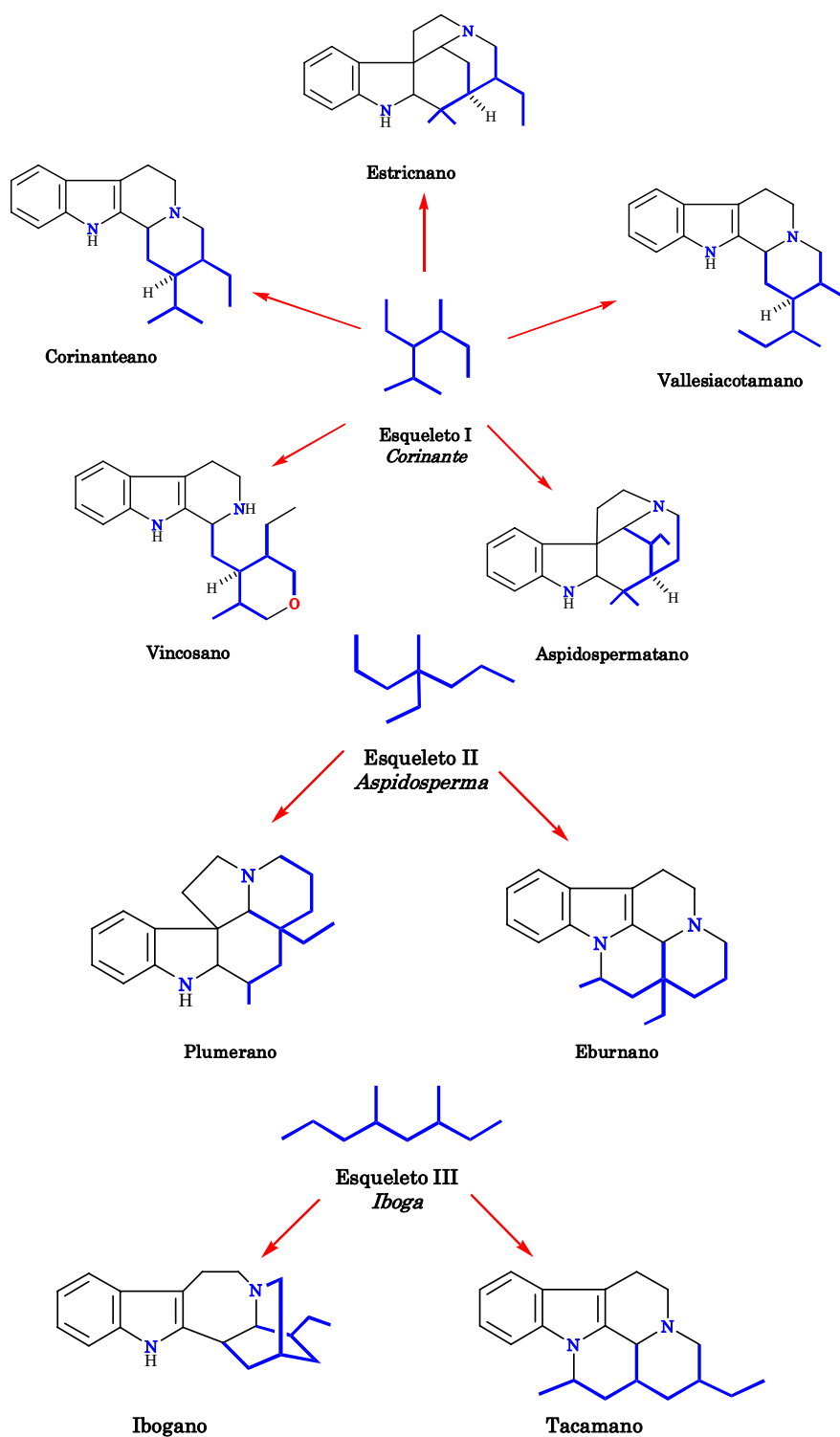


Figura 2. Tipos de esqueletos de alcaloides indólicos

Estos grupos de alcaloides se dividen convenientemente en subtipos (figura 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9) ²¹ dependiendo de la variación estructural del fragmento alicíclico o en algunos casos de la porción indólica; además, esta clasificación no es única, ²² ya que deja fuera a un gran número de alcaloides como los alcaloides oxindólicos.

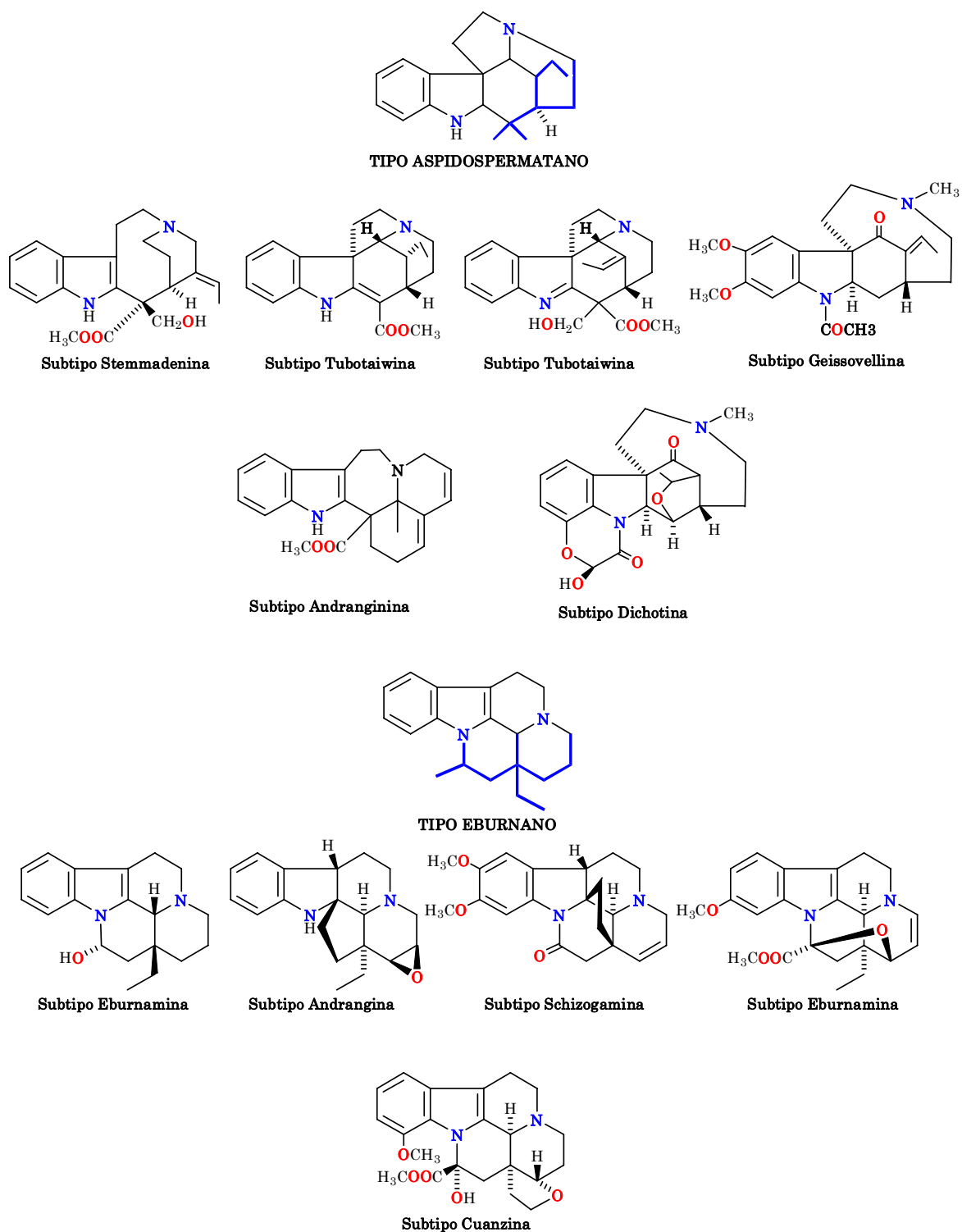


Figura 3. Subtipos de alcaloides indólico

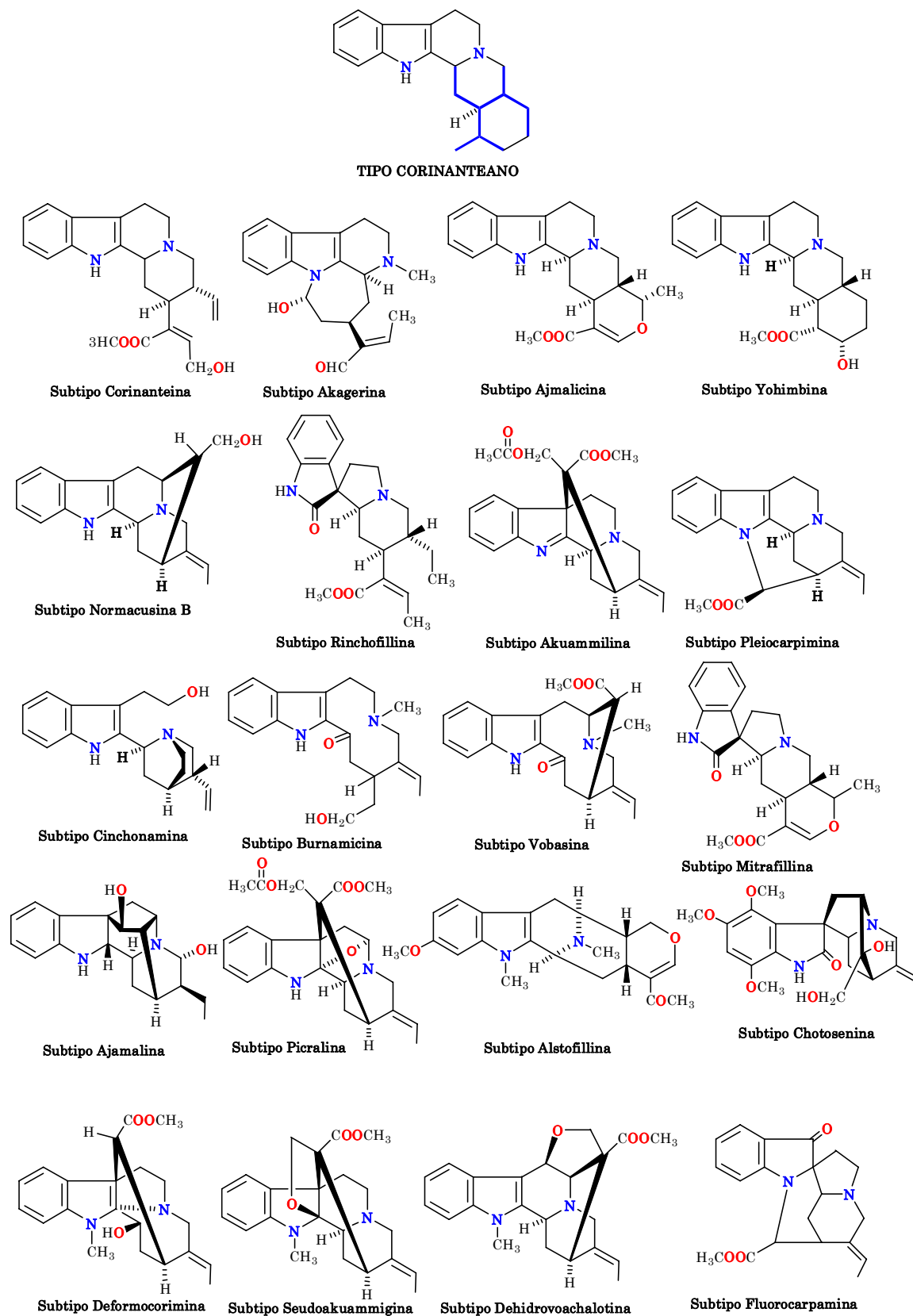


Figura 4. Subtipos de alcaloides indólicos.

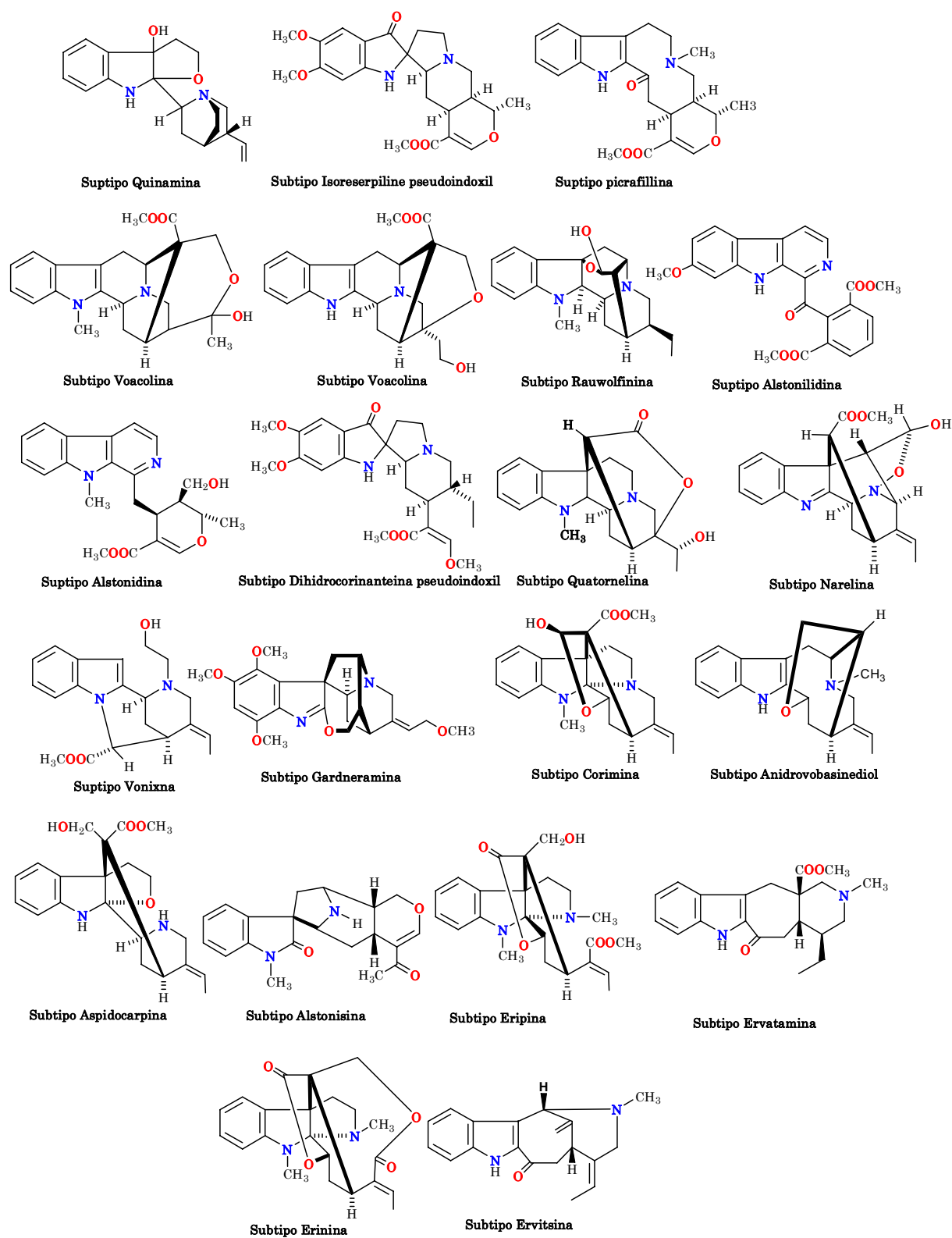


Figura 5. Subtipos de alcaloides indólicos.

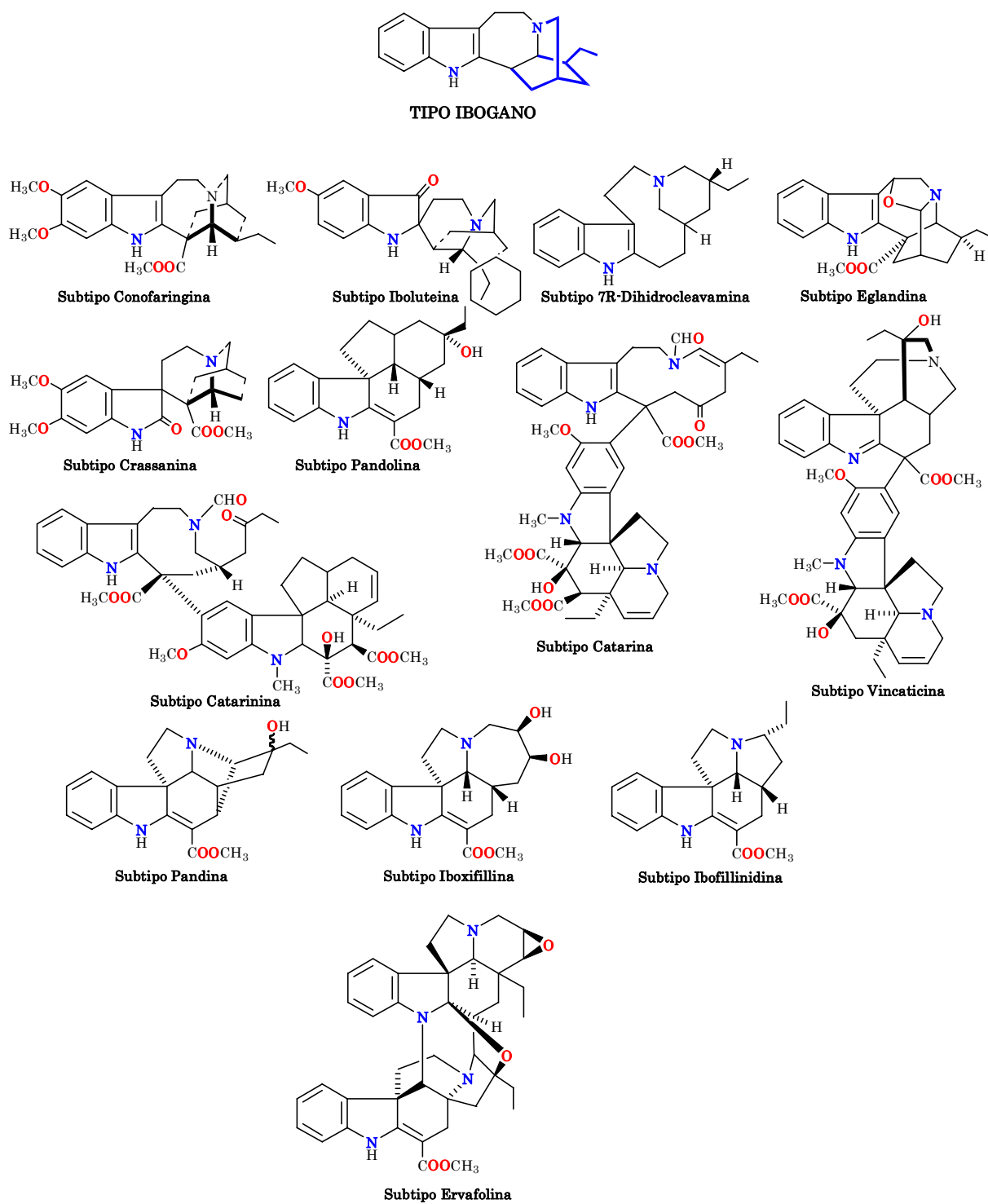


Figura 6. Subtipo de alcaloides indólicos.

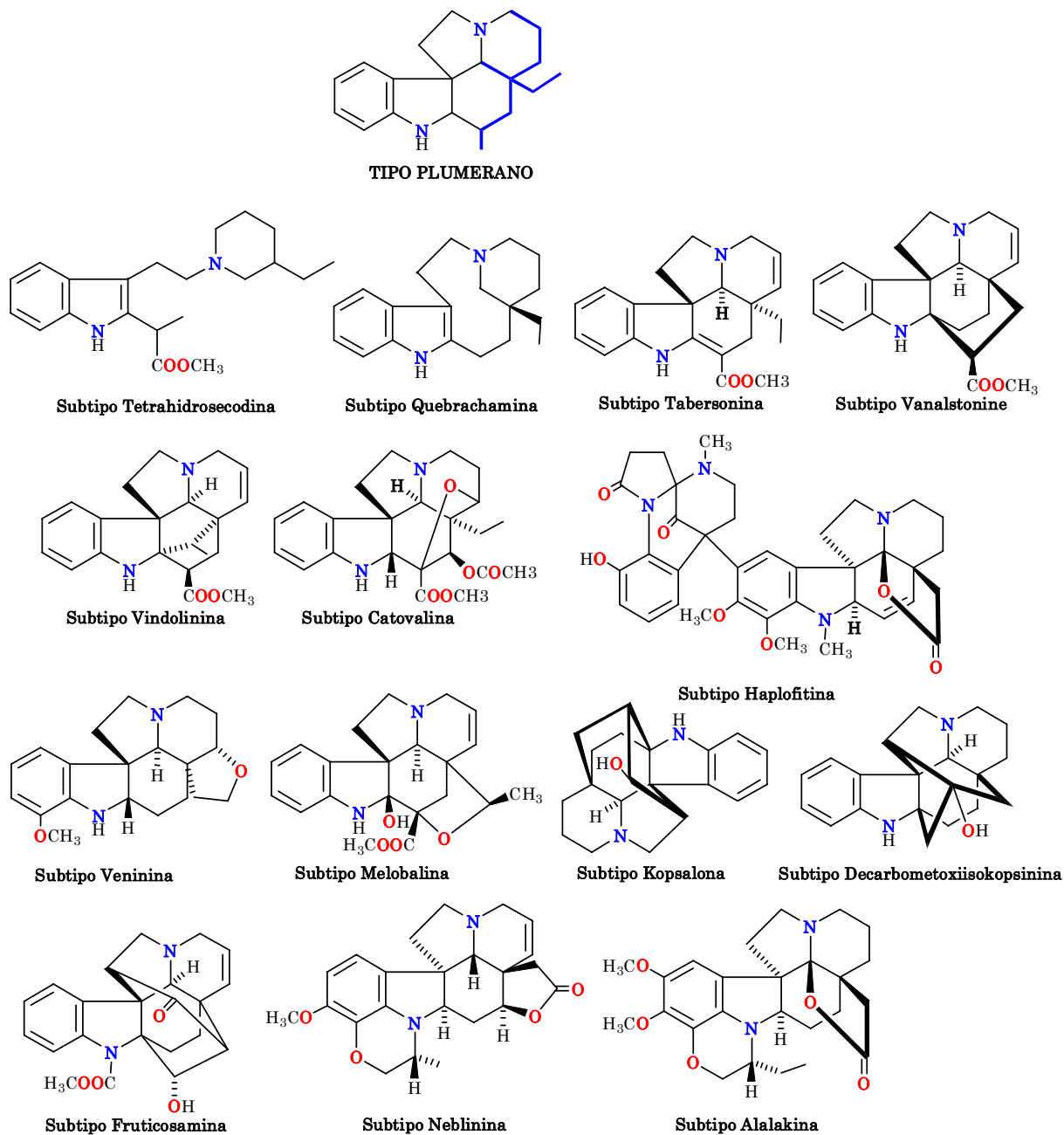


Figura 7. Subtipos de alcaloides indólicos.

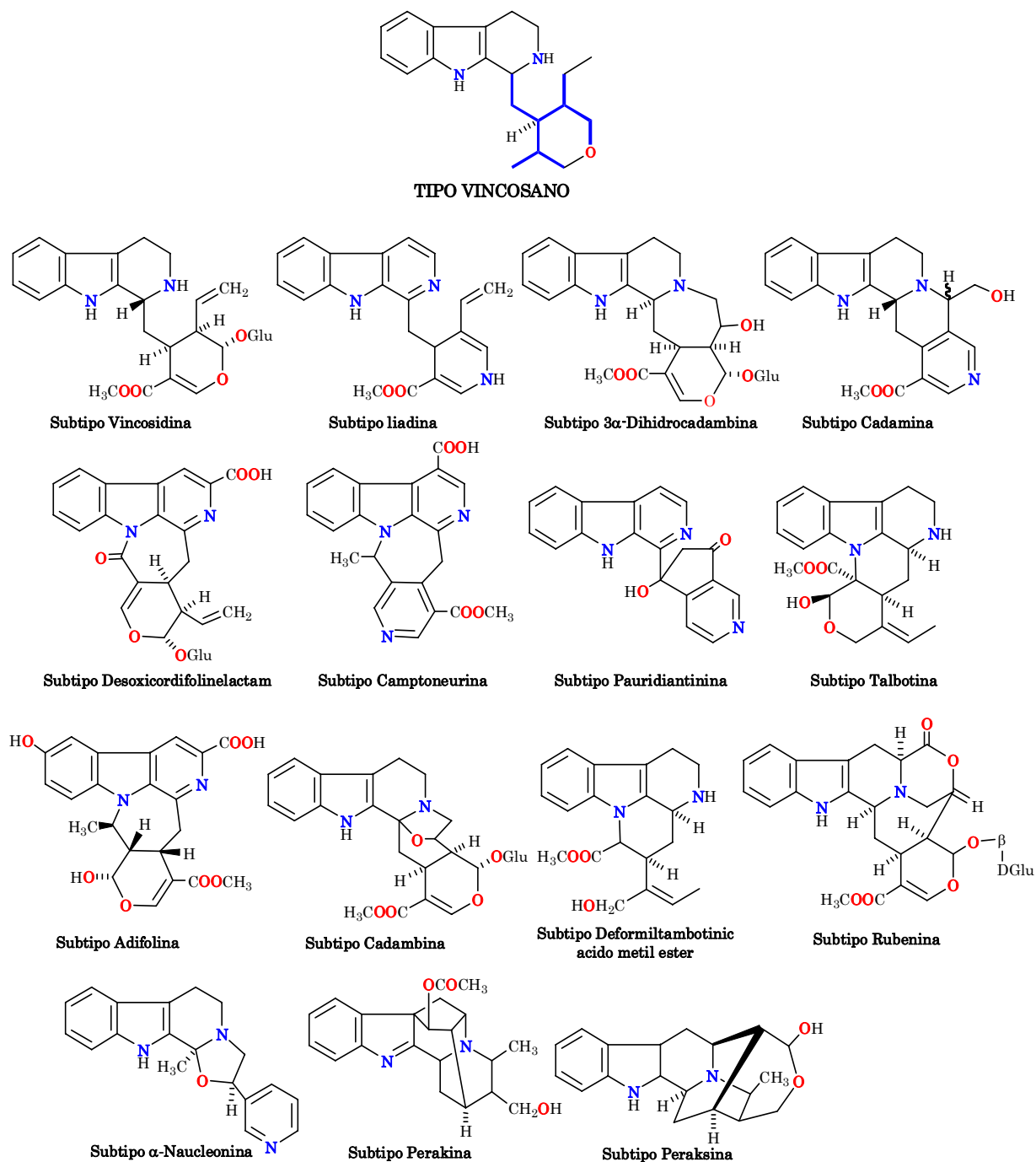
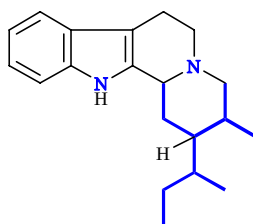
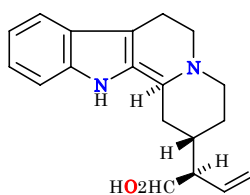


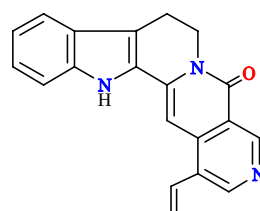
Figura 8. Subtipo de alcaloides indólicos



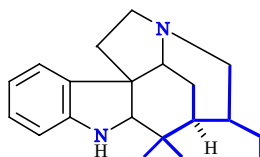
TIPO VALLESIACHOTAMANO



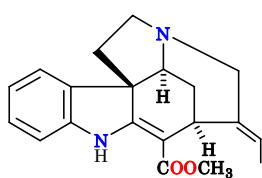
Subtipo Antirina



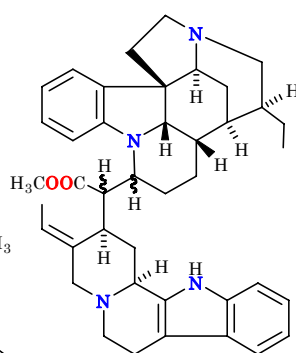
Subtipo Angustina



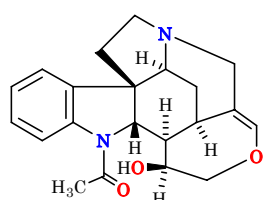
TIPO STRICNANO



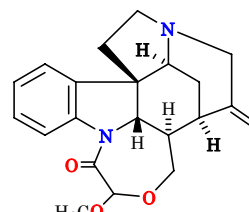
Subtipo Akuammicina



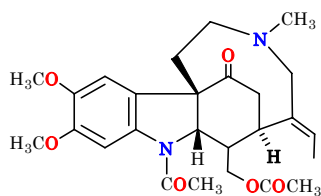
Subtipo Geissospermina



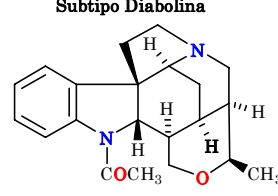
Subtipo Diabolina



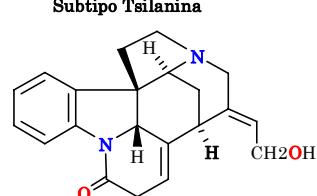
Subtipo Tsilanina



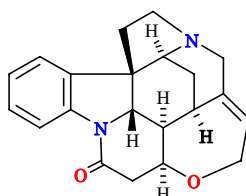
Subtipo Strichnosilidina



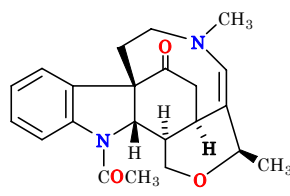
Subtipo Spermostrychnina



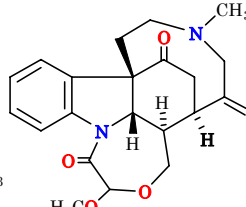
Subtipo Isostrychnina



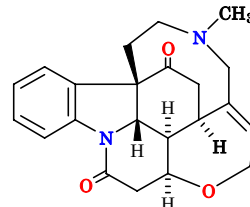
Subtipo Strichnina



Subtipo Strichnobrasilina



Subtipo Rindlina



Subtipo Icajina

Figura 9. Subtipo de alcaloides indólicos

1.2.1 ALCALOIDES INDÓLICOS DEL GÉNERO *ASPIDOSPERMA* Mart. & Zucc.

Estas especies son bien evolucionadas se caracterizan por biosintetizar alcaloides de tipo indólicos, muchos de ellos contienen esqueleto β -carbonílico simples con sistemas tricíclicos de anillos pirido-indólicos.²³

Podemos mencionar que de 56 especies de *Aspidospermas* estudiadas en el mundo, se aislaron 520 alcaloides indólicos, identificándose 247 tipos de estructuras; algunas de los más frecuentes entre las diferentes especies de este género son: (+)-uleína, 3-*epi*-uleína, (+)-*aspidospermina*, *olivacina*, *ioimbina*, *aspidoscarpina*, (-)-*aspidospermina*, 3 α ,15 α ,16 α ,17 β , 20 β -*quebrachina*, [(-)- β -*Ioimbina*]; 3 α ,15 α ,16 α ,17 β , 20 α -*quebrachina*, (+)-*guatambuina*, (+)-*quebrachamina* N-acetil-*aspidospermina*, (-)-*apparicina*, 3 α -10-Metoxigeissoschizol; 16(*R*)-*epi*-isositsirkina, *aspidolimidina*., *aspidolalbina*, 3 α , 20 β -18, 19-dihidrocorinantreol, 3 α , 20 β -10-metoxi-18, 19-dihidrocorinantreol.²³

La mayor cantidad de alcaloides se aislaron de: *A. marcgravianum* con 83 diferentes estructuras alcaloidales, *A. quebracho-blanco* con 37, *A. pyrifolium* con 23, *A. oblongum* con 21, *A. excelsum* con 19, *A. discolor* con 19 y, *A. cylindrocarpon* con 17 alcaloides. Las series de las cuales se obtuvo la mayor cantidad de alcaloides fueron: Nítida con 166 alcaloides de 9 especies estudiadas y la serie *Pyricolla* con 114 alcaloides de 16 especies.²³

2 INFORMACIÓN BOTÁNICA

2.1 FAMILIA APOCYNACEAE.

La familia Apocynaceae (cuyo nombre deriva de la palabra anglosajona “baue” que significa veneno) son especies ricas en alcaloides y muchas de ellas son tóxicas; agrupa 250 a 550 géneros y entre 3700 a 5100 especies.¹⁰

Dentro de esta familia algunos géneros de importancia alcaloidal son: *Ambelania*, *Allamanda*, *Aspidosperma*, *Condylocarpon*, *Couma*, *Forsteronia*, *Himatanthus*, *Lacmellea*, *Laxoplumeria*, *Macoubea*, *Malouetia*, *Mandevilla*, *Odontadenia*, *Parahancornia*, *Prestonia* y *Rauvolfia*.¹⁰

La familia Apocynaceae presenta características botánicas específicas; son árboles, arbustos ó lianas (hiervas) con látex blanco (claro ó coloreado) en todos los órganos. Hojas simples, opuestas ó verticiladas (alternas), enteras, con pecíolos a veces glandulares, sin (con) estípulas. Flores en cimas dicasiales, racemosas, tirsoideas ó paniculadas, terminales ó axilares, actinomorfas, bisexuales, hipóginas ó períginas (epíginas), bracteadas; cáliz gamosépalo, usualmente con glándulas adentro, (4)5(9)-lobulado, lóbulos imbricados; corola gamopétala, frecuentemente con corona de escamas ó pelos en la cara adaxial, 5-lobulado, lóbulos contornos; estambres 5, filamentos usualmente unidos a la corola, anteras libres ó usualmente conniventes alrededor del estigma, con dehiscencia longitudinal; disco presente, frecuentemente 5-lobulado; ovario súpero (seminífero), carpelos 2, unidos (sincárpico) ó libres (apocárpico) aunque usualmente unidos por el estilo, óvulos pocos a numerosos, estilo simple, estigma usualmente simple. Fruto baya, drupa, cápsula ó de 1-2 folículos secos ó coriáceos (leñosos), semillas usualmente gomosas, a veces ariladas, aladas, ó ciliadas.¹⁰

2.2 GÉNERO *ASPIDOSPERMA* Mart. & Zucc.

El género *Aspidosperma* perteneciente a la familia Apocynaceae y son características botánicas específicas del género; árboles ó arbustos, a veces con fuste fenestrado; látex generalmente ausente en el tronco, blanco ó rojizo en las ramitas. Hojas alternas (opuestas ó verticiladas), con venas secundarias poco diferenciadas y vejación terciaria inconspicua. Cimas ó tirso terminales, axilares u opositifolias, generalmente fascículo-umbeliformes, a veces ebracteadas; cáliz (4)5-lobulado, sin glándulas; corola hipocrateriforme ó tubular, usualmente blanca, verdosa ó amarillenta, levocontorta; anteras libres, ovadas; disco presente ó ausente; pistilos 2, súperos ó subínferos, libres, estigma clavado ó subcapitado. Fruto 2 folículos comprimido, a veces leñoso, a veces dolabriformes, semillas con concéntricas.^{10, 24}

2.3 CLASIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE: *Aspidosperma desmanthum* Benth. ex Müll. Arg.

Clasificación según el sistema de Cronquist²⁵

Reino : Plantae

Filo : Magnoliophyta

Grupo : Dicotiledoneae
Clase : Magnoliidae
Subclase : Asteridea
Orden : Gentianales
Familia : Apocynaceae
Género : *Aspidosperma*
Especie : *desmanthum*

Nombre común: “Quillo bordón”, “Remocaspi”



Esxicata N° 034243 J.Ruíz

Descripción: Árboles hasta de 30 m; ramitas ferrugíneo-tomentosas, con látex rojo. Hojas oblongos a obovado-oblongas, 7-16 X 3-6 cm, ápice obtuso a retuso, base cuneada a subobtus, glabras o pubérulas, a veces con envés blanco, venas secundarias 15-25 pares, pecíolos 1-1,7 cm. de largo. Cimas terminales, ca. 16 x 12 cm; lóbulos calicitos pubescentes, ca.1,5 mm. de largo; corola con tubo glabro, constricto, ca. 6 mm de largo, lóbulos lineares, ca. 2 mm de largo. Folículos lisos, ca. 12 x 10 cm, semillas incluida el ala ca. 8 cm. de diámetro 8. Esta especie se desarrolla en planicie inundable estacional (All-M,Yan).²⁵

Usos: La infusión de la corteza del tronco y de la raíz de esta especie tiene un uso escaso para el tratamiento de enfermedades febriles (malaria) en los nativos

amazónicos; sin embargo su madera aserrada es muy empleada en la construcción de viviendas.²³

2.4 UBICACIÓN GEOGRAFICA DEL GENERO *Aspidosperma*

El género *Aspidosperma* tiene aproximadamente 256 especies que se distribuye en países de clima tropical y subtropical, un aproximado de 80 especies se encuentran distribuidas entre América tropical e India Occidental. Bolzani y García agrupa estas especies en 8 series: Rígida, Nítida, Quebrachines, Polyneura, Pyricolla, Nobile, Macrocarpa y Tomentosa; estas series describen el grado de evolución de cada especie en relación a su contenido de estructuras químicas.^{25, 23}

En el Perú se han encontrado 15 especies, de las cuales 14 especies crecen en la Amazonía Peruana y 9 de ellas en la región de Loreto. Estas distribuidas por departamentos son:^{11, 26}

Aspidosperma araracanga; en Loreto y Ucayali.

Aspidosperma capitatum; en Huanuco y Pasco.

Aspidosperma cylindrocarpon (Polyneura); en Loreto, Huanuco y Junín.

Aspidosperma carapanaúba; en Madre de Dios

Aspidosperma desmanthum (Nobile); en Loreto y Ucayali.

Aspidosperma excelsum (Nitida); en Loreto y San Martín.

Aspidosperma macrocarpon (Macrocarpa); en Huanuco, Junín, San Martín y Ucayali.

Aspidosperma megaphylum; en Madre de Dios.

Aspidosperma myristicifolium; en Madre de Dios.

Aspidosperma marcgravianum (Nitida); en Loreto, San Martín, Madre de Dios y Junin.

Aspidosperma parvifolium (Pyricolla); en Loreto, San Martín, Madre de Dios, Cajamarca, Ucayali y Pasco.

Aspidosperma polyneuron (Polyneura); en Cajamarca.

Aspidosperma rigidum (Rígida); en Loreto, Madre de Dios, Huanuco y Pasco.

Aspidosperma schultesi; en Loreto.

Aspidosperma spruceanum; en Loreto, San Martín.

A la fecha se han reportado aproximadamente 56 especies de éste género con contenido alcaloidal, que incluyen 10 de las especies existentes en el Perú.²³

3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ALCALOIDES

Los alcaloides suelen tener actividad biológica incluso en dosis muy bajas. Muchos de ellos son tóxicos y otros dependiendo de la dosis a la cual se usan, por lo que se deben extremar las precauciones en terapéutica. Los alcaloides por su diversidad estructural presentan actividad biológica muy variada y son de gran aplicación. De 60 alcaloides derivados de plantas con actividad farmacológica o biológica significativa, de los cuales algunos de ellos por sus reacciones adversas al medicamento (RAMs) están en desuso; manifiestan actividad a diferentes niveles del sistema nervioso, del sistema cardiovascular o presentan acción quimioterapéutica.; un 16% de estos principios activos alcaloidales se obtuvieron de especies de la familia Apocynaceae, 13% de Papaveraceae, 10% de Solanaceae 8% de Fabaceae, 8% de Rubiaceae y en su mayoría proceden de diferentes familias con una especie bioactiva correspondiendo el 1,7 % para cada una.¹⁹

3.1 ESTUDIOS BIOLÓGICOS DEL GÉNERO *Aspidosperma*

Una revisión bibliográfica reporta que alcaloides indólicos aislados del género *Aspidosperma* presentan diversa actividad biológica; como actividad mutagénica en cepas de *Salmonella typhimurium*, en cultivos de células de mama y de pulmón, efecto inhibidor de la monoaminoxidasa (IMAO) y sobre el crecimiento y mitosis de fibroblastos cardíacos.²⁷ Otros alcaloides son antiparasitarios (epimastigotas de *Tripanosoma cruzi*) e inhibición de crecimiento en células cancerosas²⁸

La especie *A. marcgravianum* presentan actividad antimicrobiana y citotóxica.²⁹

Estudios etnobotánicos realizados por Mejia y Rengifo (1995) reportan el uso antimalárico de la especie vegetal amazónica *A. excelsum* y los alcaloides aislados de la corteza de raíz de esta especie: tetrahydrosecamine, ochrolifuanine, 16 - dimetoxicarboniltetrahydrosecamine y 16-hidroxitetrahydrosecamine, han mostrado actividad antimicrobiana contra cepas de *Bacillus subtilis* y *Saphylococcus aureus*³⁰

La *A. rigidum* y *A. excelsum* usada con mucha frecuencia por curanderos y al ser evaluados los extractos de la corteza frente a *P. falciparum* demostraron una actividad alta y mediana respectivamente.³¹ El extracto de la corteza de *A. megalocarpon* mostró actividad antimalárica contra *P. falciparum*; además los alcaloides aspidospermano y

derivados y el esqueleto de vindifformine-tabersonine podrían representar agentes potenciales de la reversión de la resistencia a la cloroquina.^{32,33} Los alcaloides Aspidoalbina y Aspidolimidina aislados de la corteza de *A. magalocarpon*, del extracto polar presentó *in vitro* actividad antimalárica frente a diferentes especies de *Plasmodium*.³⁴

De las especies *A. pyrifolium* de uso étnico en Pereiro-do-sertão por su efecto hipotensor^{35, 36} y de la *A. megalocarpon* se aislaron alcaloides indólicos monoterpénicos que poseen el esqueleto aspidospermano con actividad potenciadora antiplasmodial de la cloroquina.³²

3.2 FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS TRADICIONALES.

3.2.1 CLASIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES FÁRMACOS ANTIPALÚDICOS CLÁSICOS:^{37, 38}

- **Derivados quinolínicos:** Cloroquina (8-aminoquinoleína), y amodiaquina (4-aminoquinoleína), mefloquina (4-quinolinometanol), primaquina (8-aminoquinolina) y halofantrina (fenantreno metanol).
- **Inhibidores de la síntesis de ácido fólico:** Pirimetamina (diaminopirimidina), sulfadoxina (2, 4-diaminopiridina) y proguanil (profármaco) que es igual a cloroguanida. La asociación de los dos primeros es conocida como “fansidar”.
- **Alcaloides:** Quinina (amino alcohol conformado por un núcleo heterocíclicoquinolínico sustituido por un grupo metoxi en C-6 y un núcleo quinuclidínico con un grupo vinílico en C-3, ambos núcleos unidos por un puente hidroximetileno), quinidina (isómero de la quinina), cinconidina y cinconina.
- **Sesquiterpenos:** Artemisinina es un sesquiterpeno (1,2,4-trioxano con un puente peróxido más una lactona endoperóxido), y sus derivados artesunato, dihidroartemisina, artemeter y arteeter.
- **Antibióticos:** Tetraciclinas cuyo núcleo central es el octahidronaftaceno, la rifampicina que es un derivado semisintético macrocíclico y la clindamicina que es el derivado 7-cloro-7-desoxilincomicina.

3.2.2 ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA DE LOS FÁRMACOS CLÁSICOS

La actividad esquizonticida sanguínea corresponde a: cloroquina, quinina, amodiaquina, mefloquina, halofantina, quinidina, atovacuona sulfonamidas, tetraciclinas y clindamicina; la actividad esquizonticida tisular es propia de primaquina, proguanil, pirimetamina; los fármacos gametocitocidas son: primaquina, cloroquina y quinina y finalmente la primaquina que es hipnozoitocida.

3.2.3 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS

Los que actúan a nivel de la detoxificación del grupo HEM: La **cloroquina** (usada en la malaria por *P. vivax*), **mefloquina** y **halofantrina** tienen la capacidad de concentrarse en los hematíes infectados por un mecanismo de transporte activo y su actividad se da cuando el parásito digiere la hemoglobina. La cloroquina y acridina actúan de manera rápida e intensa sobre las vacuolas alimenticias del parásito intraeritrocitario durante la digestión de la hemoglobina, primero provoca la fusión de las vacuolas adyacentes y luego el secuestro de las vacuolas ya fusionadas y del pigmento malárico en una gran vacuola autofágica (2 horas), previniendo la polimerización de la ferroprotoporfirina IX o hemina impidiendo la formación de la hemozoína o pigmento malárico. La Quinina que sigue siendo el fármaco de elección en malaria grave o severa, la cual por ser una base débil se concentra en las vacuolas alimenticias ácidas del parásito, inhibiendo la actividad de la hem polimerasa permitiendo la acumulación del sustrato parasito-tóxico hem.^{37, 38, 39, 40}

Los que bloquean la biosíntesis del tetrahidrofolato, importante cofactor en muchas reacciones de transferencia de carbono requeridas en la síntesis del ADN, la **sulfadoxina** compite con el ácido paraaminobenzoico (PABA) por la enzima dihidropteroato sintetasa, impidiendo su unión a la molécula de pteridina en la síntesis del dihidropteroato, elemento esencial en la síntesis del ácido fólico y la **pirimetamina** actúa en parásitos en división, es antimetabolito de la dihidrofolato reductasa, impidiendo la síntesis del ácido fólico. Los plasmodios necesitan sintetizar los cofactores de folato, ya que no pueden incorporar el ácido fólico presente en la dieta. Mutaciones en las proteínas blanco han ocasionado resistencia a estas drogas, lo cual unido a la hipersensibilidad hacen su uso limitado.

La **artemisinina** y sus derivados presentan un puente de peróxido, su ruptura provocada por el Fe II del grupo hemo en la vacuola digestiva del parásito generan radicales libres orgánicos que se fijan a las proteínas de la membrana del parásito y los radicales alquilo alquilan el grupo hemo.³⁹ Sus derivados asociados a otros medicamentos (mefloquina) se usan en casos de *P. falciparum* resistente a otros esquemas.

Los antibióticos exhiben también actividad antimalárica profiláctica; el parásito posee un apicoplasto que tiene funciones de síntesis del grupo hem, síntesis de isoprenoides (DOXP) y la síntesis de ácidos grasos y ADN que codifica una serie de proteínas con capacidad de replicación, todos estos procesos son inhibidos por tetraciclinas y rifampicina.

3.2.4 RESISTENCIA Y NUEVAS PERSPECTIVAS DE ANTIMALÁRICOS

La resistencia plasmodial a antimaláricos es un problema real que amenaza la posibilidad del control de la malaria, por lo cual se mantiene una adecuada farmacovigilancia de la efectividad y eficacia del tratamiento antimalárico a nivel nacional; la mayor resistencia se da para *P. falciparum* y en el Perú la resistencia plasmodial a los antimaláricos se pone de manifiesto desde 1966 para la cloroquina frente a cepas de *P. falciparum* en el norte y la amazonía; sin embargo la resistencia a esta droga para *P. vivax* se restringe a parte de Indonesia, Papua New Guinea.

La resistencia al esquema sulfadoxina/pirimetamina (SP) es más manifiesta a nivel mundial y en la región Loreto han aparecido cepas resistentes de *P. vivax*.^{8, 9, 41, 42}

El desarrollo de la biología molecular da un conocimiento del genoma del parásito, que permite determinar el desarrollo de la resistencia a los antimaláricos clásicos e identificar una serie de procesos o rutas metabólicas que constituyen potenciales dianas terapéuticas para nuevos fármacos cabezas de serie con nuevos mecanismos de acción que apunten a: inhibir proteasas, síntesis de ácidos grasos, de rutas de biosíntesis de isoprenoides, el metabolismo mitocondrial o de pirimidinas y compuestos que interfieran el transporte o metabolismo de fosfolípidos.³²

4 TÉCNICAS ANTIMALÁRICAS *in vitro*.

Las técnicas *in vitro* donde no intervienen factores de hospedador, en la investigación de drogas antimaláricas permite con mayor eficacia y precisión obtener una información

confiable con cantidades pequeñas (microgramos) de material de la actividad intrínseca antimalárica, pueden evaluarse varias drogas a la vez sin tener problemas éticos como sucede en las pruebas *in vivo*; ⁴⁶ pero estas técnicas presenta algunas limitaciones al no poder detectar las actividades potenciales de drogas antimaláricas que requieren activación metabólica (proguanil en cicloguanil), no permite distinguir selectivamente, la seguridad y la toxicidad de los compuestos, ni detectan ciertas propiedades físico-químicas, como por ejemplo la solubilidad acuosa y la adherencia al vidrio o plástico y la exigencia de previamente evaluar la sangre donada (VIH, hepatitis, chagas, etc.). ⁴⁵

Existen varias técnicas basadas en el cultivo eritrocitario: micrométodo radioisotópico, método visual, método bioquímico: determinación de lactato deshidrogenasa (LDH) y el método fluorométrico y el método químico del FBIT. ⁴⁵

4.1 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA *in vitro*.

Trager y Jensen fueron los primeros que mantuvieron en cultivo continuo *in vitro* al *Plasmodium falciparum*. ⁴³ Desde entonces estas técnicas han constituido la base de muchos adelantos en la bioquímica, parasitología, inmunología y quimioterapia del paludismo. ⁴⁴ El cultivo de estadios intraeritrocitarios del *P. falciparum* en el medio de RPMI (Roswell Park Memorial Institute), suplementado con suero o plasma humano (10- 20 %) con renovación periódica, se funda en el conocimiento del ciclo biológico favorecido por reducción de la tensión de oxígeno (2 - 10 %) y el incremento del CO₂ (3 - 5 %). ⁴⁴

Es necesario preparar el medio con agua de buena calidad y con pH óptimo, suero de donantes sanos no tratados con antibióticos o antimaláricos, incubadora bien regulada a 37°C, evitar la contaminación con bacterias u hongos y realizar la congelación y descongelación de cepas de manera adecuada. ⁴⁰

4.1.1 CONGELACIÓN y DESCONGELACIÓN DE *Plasmodium falciparum*.

Los eritrocitos son particularmente sensibles al choque osmótico y más aún los glóbulos rojos infectados por *Plasmodium*, por lo tanto, para impedir el fenómeno de lisis, la criopreservación debe seguir rigurosamente los pasos de enfriamiento. Al congelar la cristalización provoca una deshidratación responsable de cambios en la concentración de sales y metabolitos, al eliminarse el agua del medio interno, crea un desequilibrio

osmótico que puede impedir la recuperación de la célula, además el volumen del hielo es mayor a la del agua líquida por esto es necesario usar agentes crioprotectores: sorbitol, el glicerol, la dextrosa, el dimetilsulfóxido (DMSO), que al reemplazar al agua tienen la capacidad de bajar su punto de congelación, de permeabilizar las membranas y reducir el grado de contracción de las células durante el proceso de congelación, evitando así el choque osmótico. La eliminación de estas moléculas durante la descongelación se debe realizar por grados progresivos para evitar somete a los glóbulos rojos a un estrés severo en un medio isotónico, que se hincharían por la rápida entrada del agua debido al balance osmótico, produciéndose la lisis.^{40, 45}

4.1.2 MÉTODO VISUAL PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA *in vitro* DE PRODUCTOS NATURALES Y/O SÍNTESIS

Este método esta fundamentado en el cálculo de la parasitemia de los frotis coloreados con Giemsa en solución metanólica y buffer fosfato pH = 7,4; este colorante neutro compuesto por un colorante ácido (azul de eosinato) y por un colorante básico (violeta de metileno, azul de metileno) que precipitan en agua.⁴⁷ Los protozoarios disocian el colorante neutro: los núcleos (ADN) se tiñen de rojo y el citoplasma de azul.^{45, 46}

4.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA *in vitro* MEDIANTE TEST DE LA FERROPROTOPORFIRINA IX (FBIT)

Durante su desarrollo intraeritrocitario el parásito de malaria degrada grandes cantidades de hemoglobina dentro de una vacuola digestiva,⁴⁸ liberando ferriprotoporfirina IX (FPIX), un compuesto potencialmente tóxico para el parásito, el cual provoca desde lisis de la membrana hasta la inactivación de enzimas indispensables para su alimentación, como la plasmepsina I y II Y la falcipaina. Normalmente el parásito detoxifica la FPIX formando un polímero insoluble atóxico la hemozoína (pigmento malárico) asegurando su supervivencia⁴⁹. Esta función especializada hace a la vacuola digestiva un blanco de elección para la quimioterapia antimalárica, un fármaco capaz de inhibir la polimerización de la FPIX sería letal para el parásito.^{50, 51, 52, 53}

La técnica del FBIT evalúa la actividad de una sustancia fundamentada en este principio de detoxificación⁵³

CAPÍTULO II

1 MATERIALES Y MÉTODOS.

1.1 MATERIAL BOTÁNICO

Se colectó la corteza de la raíz de *Aspidosperma desmanthum* Benth. Ex Müll. Arg. de un árbol joven del ARBORETUM “EL HUAYO” Puerto Almendra, Facultad de Ingeniería Forestales, distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas. La especie fue identificada por el Ing. forestal Juan Celedonio Ruiz Macedo, del Herbarium Amazonense de la UNAP, la exicata se encuentra depositada y codificada con el N° 034243 J. Ruiz.

1.2 MATERIALES DE LABORATORIOS Y OTROS

- Celdas cromatográficas
- Pipetas Pasteur
- Fiolas
- Viales
- Matraces
- Capilares
- Desecadores
- Adaptadores (varios tamaños)
- Cápsulas de porcelana
- Embudo de filtración simple
- Columnas cromatográficas (varios tamaños)
- Microcolumnas (pipetas de 10mL y pipetas pasteur)
- Vasos de precipitado (varios tamaños)
- Peras de separación (diferentes volúmenes)
- Probetas (5, 10, 50, 100, 500 mL)
- Erlenmeyers (10, 50, 100, 250 mL)
- Balones de fondo redondo de diferentes volúmenes y bocas
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Nueces para soporte

- Espátulas (varios tamaños)
- Papel higiénico y algodón
- Pinzas metálicas
- Soporte universal
- Toalla

1.3 SOLVENTES ORGÁNICOS Y REACTIVOS

- Hexano (Hx)
- Ciclo Hexano
- Cloroformo (CHCl_3)
- Acetato de etilo (EtOAc)
- Dietilamina
- Metanol (MeOH)
- Etanol (EtOH)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4)
- Agua destilada (H_2O)
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4)
- Reactivo de Dragendorff: Se disuelve 8.0 g. de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ en 20 mL de HNO_3 y 27,2 g. de KI en 50 mL de agua destilada se mezclan las 2 soluciones y se deja reposar por 24 horas. Se decanta la solución y se enrasa a 100 mL.

1.3.1 ADSORBENTES

- Cromatofolios de óxido de aluminio neutro tipo E60 - F₂₅₄. MERCK. (art. 5581).
- Cromatofolios de óxido de aluminio básico polygram alox N/U V₂₅₄. MACHEREY –NÁGEL, (art. 802023).
- Cromatofolios de óxido de Silicio 60 - F₂₅₄. MERCK (art. 1.05554).
- Cromatofolios de óxido de silicio poligram sil G/U V₂₅₄. MACHEREY – NÁGEL.
- Óxido de aluminio 90 (Actividad II y III) (art. 1097), MERCK.
- Óxido de aluminio básico Actividad I (art. 1076), MERCK.
- Óxido de silicio 60 (art. 1.07734), MERCK.

1.4 EQUIPOS

- Cocinilla eléctrica
- Estufa eléctrica Memmert 60°C
- Computadora
- Rotavapor BÜCHI modelo R-124, Water bath B-481
- Equipo de destilación BRAND Mono Dest 3000.
- Bomba de vacío Gelman Sciences, Vacuum 24 in Hg -600mg Hg
- Lámpara de U.V. Entela Modelo UVLS-28 Long/Short.
- Lámpara U.V. Entela Modelo UVGL-25, multibanda Uv-254/365 nm
- Balanza electrónica digital Sartorius CP3245
- Espectrómetro de masa Vg - Micromass modelo Zab 2F
- Espectrofotómetro UV
- Espectrofotómetro de infra-rojo Perkin - Elmer modelo 1600 / FTIR
- Punto de fusión REICHERT THERMOVAR tipo KOEFLER
- Polarímetro Perkin - Elmer modelo 343 Plus a 25°C usando la línea D de sodio
- Espectrómetro de resonancia magnética nuclear BRUKER. Avance 400 MHz en ^1H y 100 MHz en ^{13}C y BRUKER, AMX 500 MHz en ^1H y 125 MHz en ^{13}C

2 TÉCNICAS INSTRUMENTALES

Los espectros fueron realizados en el Instituto de Productos Naturales y Agro Biología de Canarias IPNA-CSIC), Tenerife España por el apoyo del Sr. Matias Reyna Artiles Ph.D.

2.1 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C , han sido realizados en espectrómetros Bruker, Avance 400 MHz en ^1H y 100 MHz en ^{13}C y Bruker, AMX 500 MHz en ^1H y 125 MHz en ^{13}C . Los productos se disolvieron en 0,5mL de CDCl_3 y como referencia interna se usó CHCl_3 .

Los experimentos de correlación homo y heteronuclear ^1H – COSY, NOESY, HSQC y HMBC fueron realizados en el espectrómetro Bruker AMX de 500 MHz, usando los programas suministrados por la firma de Bruker. La interpretación de los espectros HSQC y HMBC permitió la asignación de los carbonos de la molécula. La estereoquímica de los compuestos fueron determinados por la interpretación de los experimentos

bidimensionales de NOESY, COSY. Los valores de los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en ppm en relación con el disolvente empleado como referencia interna y las constantes de acoplamiento (J) en Hz.

2.2 ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM)

Los espectros de masas de baja y alta resolución fueron realizados con un espectrómetro Vg - Micromass modelo Zab 2F. La temperatura de la fuente fue de 220°C y la energía de ionización de 70 eV. Para cada producto se indica los picos más significativos y su intensidad relativa.

2.3 ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJO (IR)

Los espectros de IR se realizaron en un espectrofotómetro Perkin - Elmer modelo 1600 / FTIR. El producto puro se disolvió en CHCl_3 seco se aplicó en la superficie de una pastilla de NaCl (5mm de espesor), evaporándose el disolvente a continuación. La frecuencia (ν) se expresó en cm^{-1} .

2.4 ESPECTROSCOPÍA DE ULTRAVIOLETA (UV)

Los espectros de UV se efectuaron en un espectrofotómetro Hewlet-Packard HP-8254-A diodo array, usando etanol como disolvente.

2.5 ACTIVIDAD ÓPTICA

Las actividades ópticas se midieron en un polarímetro Perkin - Elmer modelo 343 Plus a 25°C usando la línea D de sodio; como disolvente se usó CHCl_3 seco y se utilizaron células de 1dm de longitud. La concentración se expresó en g / 100 mL de disolución.

2.6 PUNTO DE FUSIÓN (PF)

Los puntos de fusión se determinan en un aparato REICHERT THERMOVAR tipo KOEFLER el cual no se encontraba operativo.

2.7 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.

2.7.1 CROMATOGRAFÍA DE COLUMNAS (CC)

Para las cromatografías en columna, se usaron como fase estacionaria alúmina básica actividad I art 1076, alúmina 90 actividad II y III art 1097 y sílicagel 60 art 1.07734.

Como fase móvil se utilizó mezclas de disolventes de hexano – acetato de etilo y acetato de etilo - metanol de polaridad creciente.

2.7.2 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF)

El seguimiento de las columnas cromatográficas se hizo por cromatografía de capa fina (CCF), utilizando placas comerciales: Cromatofolios de óxido de aluminio 60 F₂₅₄ neutro, tipo E (MERCK), cromatofolios de óxido de aluminio básico Polygram Alox N/UV₂₅₄ (NACGEREY – NAGEL), cromatofolios de gel de sílice F 1500/LS 254 (MERCK) y cromatofolios de óxido de silicio Poligram Sil G/U V₂₅₄. MACHEREY – NAGEL. Como eluyente se usaron los mismos solventes que para las columnas cromatográficas. Para la visualización de los alcaloides se empleó el reactivo de Dragendorff.

2.7.3 CROMATOGRAFÍA EN CAPA GRUESA PREPARATIVA (CCGP).

Para la separación de los productos se utilizaron los mismos cromatofolios que en cromatografía en capa fina 20 x 20cm, dichas placas se usaron a escala preparativa, sembrándose en éste caso entre 10 y 25 mg de producto por placa.

Como fase móvil se usó los mismos disolventes que en cromatografía de columna y en algunos casos se eluyó con ciclohexano y dietilamina.

3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRAS.

La corteza de raíz de *Aspidosperma desmanthum* Benth. ex Müll. Arg. fue colectada, acondicionada y secada a temperatura ambiente, luego fue molida y se peso 550g, para preparar el extracto etanólico.

3.2 EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES DE LA CORTEZA DE RAÍZ DE *Aspidosperma desmanthum* Benth. ex Müll. Arg.

A la corteza de raíz de *Aspidosperma desmanthum* seca y molida (550g) se adicionó 4 litros de etanol y se dejó en maceración durante 48 horas, se filtró; este proceso se repitió 7 veces hasta agotamiento. El filtrado se concentró a presión reducida en rotavapor recuperándose el solvente y se obtiene 44,05 g de extracto etanólico.

El extracto etanólico obtenido, se disuelve con H₂SO₄ 0.1M, y se filtra. La fase acuosa se lleva a un pH 2, se extrae con 150 mL de CHCl₃ repetidas veces hasta agotamiento, el extracto clorofórmico se concentra en rotavapor a presión reducida hasta sequedad y se obtiene 4.56g de extracto alcaloidal ácido.

La fase acuosa ácida se basifica a pH = 10 con solución saturada de NaOH y se extrae con 150mL de CHCl_3 hasta agotamiento; después de evaporar el solvente en rotavapor se obtiene 3.15g de extracto alcaloidal básico. El esquema de extracción se muestra en el diagrama N° 01.

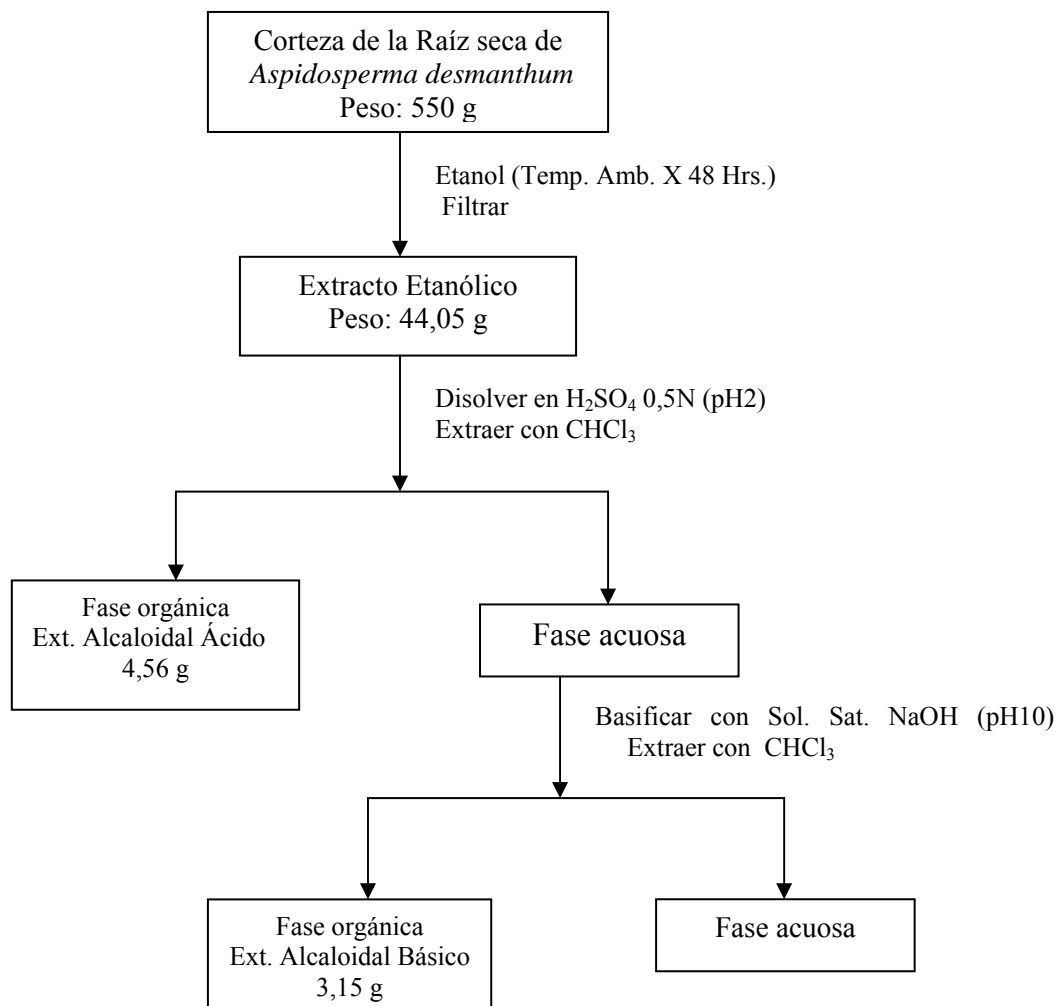


Figura 10. Diagrama de extracción de alcaloides de la Corteza de Raíz de *Aspidosperma desmanthum* Benth. ex Müll. Arg.

3.3 FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO ALCALOIDAL ÁCIDO DE LA CORTEZA DE RAÍZ DE *A. desmanthum*

El extracto alcaloidal ácido (4,56 g), se fraccionó en una columna cromatográfica de diámetro interno 4cm y altura de relleno 12cm se utilizó como fase estacionaria el adsorbente óxido de aluminio neutro activado (Al_2O_3), como fase móvil se utilizó mezclas de solventes como: hexano, acetato de etilo, metanol de polaridad creciente.

Se obtuvo 264 fracciones de 200 mL cada una estas fracciones se concentraron en rotavapor hasta sequedad. El análisis cromatográfico de las fracciones obtenidas en cromatografía de capa fina y observados a la luz de la lámpara de UV y revelado con Dragendorff nos permitió agrupar en 7 fracciones: **M** 18-22 (53,2 mg), **N** 17,21-23 (135,7 mg), **Ñ** 29-41 (202.7 mg), **O** 42-55 (59 mg), **P** 75-92 (219,0 mg) y **R** 162-264 (673,2 mg).

3.3.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES ALCALOIDALES OBTENIDAS DEL EXTRACTO ALCALOIDAL ÁCIDO. DE LA CORTEZA DE RAÍZ DE *A. desmanthum*.

La fracción **M** 18-22 se cristalizó en acetato de etilo y gotas de hexano; se obtiene el Cristal **C** (18-20) (53,2 mg) y el agua madre **Am** (18-20). Los Cristales (**18-20**) (53,2mg), después de realizar los estudios de: EM, RMN de ^1H y ^{13}C experimentos homo y bidimensionales se identificó como: **ASPIDOLIMINA (1)**

El agua madre del **C18-20** se une con la fracción 17 y fracción 21-23 obteniéndose la fracción **N** 17, 21-23 (135,7 mg) la misma que se fraccionó en una columna cromatográfica de diámetro interno 2cm y la altura de relleno 12cm, se utilizó como fase estacionaria el adsorbente óxido de aluminio neutra activada, como fase móvil se empleo una mezcla de solventes hexano – acetato de etilo de polaridad creciente. Obteniéndose 23 fracciones de 50 mL c/v, se llevó a sequedad en rotavapor. El análisis cromatográfico de las fracciones mediante cromatografía de capa fina (CCF) en cromatofolios de óxido aluminio 60 F₂₅₄, observado a la luz de la lámpara de UV y revelados con Dragendorff nos permitió agrupar en 2 fracciones: fracción 13 (85,3 mg) y fracción 15-23 (12.5mg).

La fracción 13 (85,3 mg) se sembró en 04 cromatofolios de oxido de aluminio 60 F₂₅₄ a escala preparativa, como fase móvil se utilizó mezcla de hexano-acetato de etilo (95:05), se eluyó (5) veces, a la luz de la lámpara del UV se observa dos alcaloides uno de ellos mayoritario; ambos se separan del adsorbente purificándose en micro columna, como fase estacionaria se utilizó oxido de aluminio neutra activada (Al₂O₃) y como fase móvil hexano – acetato de etilo (90:10), obteniéndose 25,9 mg del alcaloide **13 PTLC-1** y 12,5 mg del alcaloide **13 PTLC-2**, que después de realizar los estudios de RMN de

^1H y ^{13}C , EM, experimentos homo y bidimensionales ambos se identificaron como: **ASPIDOLIMINA (1)**

La fracción Ñ 29-41 (202,7mg) se fraccionó en una columna cromatográfica de diámetro interno 2cm y altura de relleno 12 cm, se utilizó como fase estacionaria el adsorbente óxido de aluminio neutra activada (Al_2O_3), como fase móvil se utilizó mezcla de solventes como hexano – acetato de etilo de polaridad creciente. Obteniéndose 39 fracciones de 50 mL c/u, se llevó a sequedad en rotavapor. El análisis cromatográfico de las fracciones mediante cromatografía de capa fina (CCF) en cromatofolios de óxido aluminio 60 F₂₅₄, observado a la luz de la lámpara de UV y revelados con Dragendorff nos permitió agrupar en 2 fracciones: fracción 21-25 (105,6 mg) y fracción 26-39 (70,0mg).

La fracción 21-25 (105,6 mg) se purificó en una micro columna, como fase estacionaria se utilizó óxido de silicio (Si_2O) y como fase móvil hexano – acetato de etilo (90:10) obteniéndose 65,0 mg del alcaloide 21-25, por contener impurezas a la cromatografía analítica se volvió a cromatografiar en micro columna, como fase estacionaria se utilizó óxido de aluminio básico actividad I (Al_2O_3) y como fase móvil hexano – acetato de etilo (90:10) obteniéndose 47,5 mg del alcaloide **21-25**, los estudios de RMN nos permitió identificar este alcaloide como: **ASPIDOSCARPINA (2)**

La fracción 26-39 (70,0 mg) se sembró en (04) cromatofolios de óxido de silicio – 60 a escala preparativa, se eluyó (07) veces en mezcla de ciclo hexano-dietilamina (98:02), a la luz de la lámpara del UV se observa dos alcaloides. Después de separar los alcaloides del adsorbente se purificó en una microcolumna como fase estacionaria el adsorbente óxido de aluminio básica actividad I (Al_2O_3), como fase móvil se utilizó mezclas de solventes como hexano- acetato de etilo (90:10) obteniéndose 24,2 mg del alcaloide 26-39 PTLC-1 y 3,2 mg del alcaloide 26-39 PTLC-2, por contener impurezas a la cromatografía analítica se volvió a cromatografiar individualmente en micro columna, como fase estacionaria se utilizó óxido de aluminio básico actividad I (Al_2O_3) y como fase móvil hexano – acetato de etilo (90:10) obteniéndose: 0.9 mg del alcaloide 26-39 PTLC-2, cantidad insuficiente para realizar los estudios de RMN y 11,2 mg del alcaloide **26-39 PTLC-1** los estudios de RMN nos permitió identificar este alcaloide como: **ASPIDOSCARPINA (2)**

La fracción **O** 42-55 (59,0 mg) se sembró en (03) cromatofólios de óxido de silicio – 60 a escala preparativa, se eluyó (02) veces en mezcla de ciclo hexano-dietilamina (90:10), a la luz de la lámpara de UV se observa un alcaloide 34,8 mg. Después de separar el alcaloides del adsorbente se purificó en micro columna, como fase estacionaria se utilizó óxido de aluminio básica actividad I (Al_2O_3), como fase móvil hexano – acetato de etilo (60:40) obteniéndose 1.3mg del alcaloide codificado como 42-55 PTLC-1, después de realizar los estudios de: EM, RMN de ^1H y ^{13}C experimentos homo y bidimensionales se identificó como: **19,20 –DIHIDRO, 11-METOXI-(+)-LIMATINA (4)**

La fracción **P** 75-92 (219.0 mg), se fraccionó en una columna cromatográfica de diámetro interno de 2.3cm y altura de relleno 12cm, se utilizó como fase estacionaria el adsorbente de óxido de aluminio actividad I básico (Al_2O_3), como fase móvil se utilizó solventes como hexano y mezclas acetato de etilo de polaridad creciente. Se obtuvo 60 fracciones de 50 mL, el solvente se evaporó en rotavapor hasta sequedad. El análisis cromatográfico en capa fina (CCF) en cromatofólios de óxido aluminio 60 F_{254} , observado a la lámpara de UV y revelado con Dragendorff nos permitió agrupar en una sola fracción 37-60 de 106,8mg.

La fracción 37-60 (106,8 mg) se purificó en microcolumna, como fase estacionaria se utilizó el adsorbente de óxido de aluminio (Al_2O_3) actividad I y II, como fase móvil se utilizó solventes como hexano - acetato de etilo (60:40) obteniéndose 79,2 mg del alcaloide 37-60, por contener impurezas se volvió a cromatografiar en micro columna como fase estacionaria se utilizó el adsorbente de óxido de aluminio (Al_2O_3) actividad I y II, como fase móvil se utilizó solventes como hexano - acetato de etilo (50:50) obteniéndose 51,9 mg del alcaloide 37-60, que se sembró en (02) cromatofolios de óxido de silicio – 60 a escala preparativa, se eluyó (02) veces en mezcla de ciclo hexano-dietilamina (80:20), a la luz de la lámpara del UV se observa un solo producto alcaloide. Después de separar el alcaloide del adsorbente se purificó en una micro columna, como fase estacionaria se utilizó óxido de aluminio básica (Al_2O_3) actividad I y II, como fase móvil hexano – acetato de etilo (80:20) obteniéndose 4,5 mg del alcaloide **37-60 PTLC-1**; después de realizar los estudios de: EM, RMN de ^1H y ^{13}C experimentos homo y bidimensionales se identifico como: **14, 15-DIHIDROALALAKINA (3).**

La fracción **R** 162-264 (673,2 mg) se cromatografió en columna cromatográfica de 4cm de diámetro interno y altura de relleno 12cm; se utilizó como fase estacionaria el adsorbente de óxido de aluminio básico (Al_2O_3) actividad I, como fase móvil se utilizó mezclas crecientes de solventes como hexano y mezclas acetato de etilo. Se obtuvo 112 fracciones de 150 mL cada una, el solvente se evaporó en rotavapor hasta sequedad. El análisis cromatográfico mediante cromatografía de capa fina (CCF) en cromatofolios de óxido aluminio 60 F₂₅₄, observado a la lámpara de UV y revelado con Dragendorff nos permitió agrupar en tres fracciones: 46-53 de (74,7 mg) fracción 54-65 de (164,0 mg), 66-85 de (66,2 mg), y fracción 86-112 de (115,3 mg).

La fracción 46-53 de (74,7mg) se cromatografió en columna cromatográfica de 15 mm de diámetro interno, se utilizó como fase estacionaria el adsorbente de óxido de aluminio básico (Al_2O_3) actividad I, como fase móvil se utilizó mezclas crecientes de solventes como hexano y mezclas acetato de etilo. Se obtuvo 66 fracciones de 75mL cada una, el solvente se evaporó en rotavapor hasta sequedad. El análisis cromatográfico mediante cromatografía de capa fina (CCF) en cromatofolios de óxido aluminio 60 F₂₅₄, observado a la lámpara de UV y revelado con Dragendorff nos permitió agrupar en una fracción: 43-66 de (38.2 mg) se sembró en (02) cromatofolio de óxido de silicio - 60 a escala preparativa, se eluyó (4) veces con mezcla ciclo hexano - dietilamina (90:10) a la luz de la lámpara del UV se observa un alcaloide. Después de separar el alcaloide del adsorbente se purificó en una micro columna, como fase estacionaria se utilizó óxido de aluminio básico actividad I (Al_2O_3) y como fase móvil hexano – acetato de etilo (90:10) obteniéndose 2,9 mg del alcaloide codificado como **43-66 PTLC** después de realizar los estudios de: EM, RMN de ^1H y ^{13}C experimentos homo y bidimensionales se identificó como: **19,20 –DIHIDRO, 11-METOXI-(+)-LIMATINA (4)**.

La fracción 54-65 de (164 mg) se purificó en columna de 1 cm de diámetro y altura de relleno 12cm, como fase estacionaria se utilizó el adsorbente de óxido de aluminio básico (Al_2O_3) actividad I, como fase móvil hexano - acetato de etilo (90:10) obteniéndose 133,3 mg del alcaloide 54-65, por contener impurezas se volvió a cromatografiar en micro columna de 1cm de diámetro, como fase estacionaria se utilizó óxido de aluminio básica (Al_2O_3) actividad I, como fase móvil hexano-acetato de etilo (90:10) obteniéndose 131,3mg del alcaloide **54-65**, después de realizar los estudios de:

EM, RMN de ^1H y ^{13}C experimentos homo y bidimensionales se identifico como: **19,20 –DIHIDRO, 11-METOXI-(+)-LIMATINA (4).**

La fracción 66-85 (66,2 mg), se cromatografió en columna cromatográfica de 15,0 mm de diámetro interno y altura de relleno 12 cm, se utilizó como fase estacionaria el adsorbente de óxido de aluminio básico (Al_2O_3) actividad I, como fase móvil se utilizó mezclas crecientes de solventes como hexano y mezclas acetato de etilo. Se obtuvo 81 fracciones de 50 mL cada una, el solvente se evaporó en rotavapor hasta sequedad. El análisis cromatográfico mediante cromatografía de capa fina (CCF) en cromatofolios de óxido aluminio 60 F₂₅₄, observado a la lámpara de UV y revelado con Dragendorff nos permitió agrupar en una fracción 39-81 de (37,5 mg) la cual se sembró en (02) cromatofolio de óxido de silicio - 60 a escala preparativa, se eluyó (5) veces con mezcla ciclo hexano - dietilamina (90:10) a la luz de la lámpara del UV se observa un alcaloide. Después de separar el alcaloide del adsorbente se purificó en una microcolumna, como fase estacionaria se utilizó oxido de aluminio básico actividad I (Al_2O_3) y como fase móvil hexano-acetato de etilo (90:10) obteniéndose 4,8 mg del alcaloide codificado como **39-81 PTLC** después de realizar los estudios de: EM, RMN de ^1H y ^{13}C experimentos homo y bidimensionales se identifico como: **19,20 – DIHIDRO, 11-METOXI-(+)-LIMATINA (4).**

La fracción 86-112 de (115,3 mg) se sembró en (04) cromatofolio de oxido de silicio - 60 a escala preparativa, se eluyó (2) veces con mezcla ciclo hexano - dietilamina (80:20) a la luz de la lámpara del UV se observa dos alcaloides siendo uno de ellos mayoritario. Después de separar el alcaloide del adsorbente se purificó en una micro columna, como fase estacionaria se utilizó oxido de aluminio básico actividad I (Al_2O_3) y como fase móvil hexano – acetato de etilo (50:50) obteniéndose 4,7 mg del alcaloide codificado como **86-112 PTLC-1**, después de realizar los estudios de: EM, RMN de ^1H y ^{13}C experimentos homo y bidimensionales se identificaron como: **19,20 –DIHIDRO, 11-METOXI-(+)-LIMATININA (5)**

3.4 FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO ALCALOIDAL BÁSICO DE LA CORTEZA DE RAÍZ DE *A. desmanthum*.

El extracto alcaloidal básico (3,15 g) se fraccionó en una columna cromatográfica de un diámetro interno de 4 cm y altura de relleno 12 cm; se utilizó como fase estacionaria el

adsorbente de óxido de aluminio básico actividad I (Al_2O_3), como fase móvil se utilizó solventes como hexano, acetato de etilo, metanol y mezclas de polaridad creciente. Se obtuvo 49 fracciones de 250 mL cada una que se lleva a un rotavapor hasta sequedad. El análisis cromatográfico mediante cromatografía de capa fina (CCF) en cromatofolios de óxido aluminio 60 F₂₅₄, observado a la lámpara de UV y revelados con Dragendorff nos permitió agrupar en 2 fracciones: **S 25-33** (25,3mg) y **T 42-49** (155,2mg).

3.4.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES ALCALOIDALES OBTENIDAS DEL EXTRACTO ALCALOIDAL BÁSICO DE LA CORTEZA DE RAÍZ DE *A. desmanthum*.

La fracción **S 25-33** de (25,3 mg) se fraccionó en una columna cromatográfica de un diámetro interno de 0,9 cm y altura de relleno 12 cm, se utilizó como fase estacionaria el adsorbente de óxido de aluminio básico actividad I (Al_2O_3), como fase móvil se utilizó solventes como hexano, acetato de etilo, metanol y mezclas de polaridad creciente. Se obtuvo 20 fracciones de 5mL cada una que se lleva a un rotavapor hasta sequedad. El análisis cromatográfico mediante cromatografía de capa fina (CCF) en cromatofolios de óxido Aluminio 60 F₂₅₄, observado a la lámpara de UV y revelados con Dragendorff nos permitió agrupar en 1 fracción: 12-18 (19,6mg) se sembró en cromatofolios de óxido de aluminio 60 F₂₅ (Al_2O_3) a escala preparativa, se eluyó (4) veces con mezclas de solventes ciclo hexano-dietilamina (85:15) a la luz de la lámpara del UV se observa dos alcaloides mayoritarios. Después de separar los alcaloides del adsorbente se purificó en una micro columna, como fase estacionaria se utilizó óxido de aluminio básico actividad I (Al_2O_3) y como fase móvil hexano – acetato de etilo (20:80) obteniéndose 1,8 mg del alcaloide codificado como **25-33 PTLC-1** y 5,1 mg del alcaloide codificado como **25-33 PTLC-2** que después de realizar los estudios de: EM, RMN de ^1H y ^{13}C experimentos homo y bidimensionales se identificaron como: **ASPIDOLIMIDINA (6)**

La fracción **T 42-49** (155,2mg) se sembró en (04) cromatofolios de óxido de aluminio 60 F₂₅ (Al_2O_3) a escala preparativa, se eluyó (4) veces con mezclas de solventes hexano-acetato de etilo (80:20) a la luz UV se observó un alcaloide 42-49 PTLC-2. Después de separar el alcaloide del adsorbente se purificó en micro columna como fase estacionaria se utilizó óxido de aluminio básico actividad I (Al_2O_3) y como fase móvil hexano – acetato de etilo (50:50) obteniéndose 4,1 mg del alcaloide codificado como: **42-49**

PTLC-2 que después de realizar los estudios de: EM, RMN de ^1H y ^{13}C experimentos homo y bidimensionales se identificó como: **RHAZINILAM (7)**

3.5 DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE LOS ALCALOIDES AISLADOS

De los extractos alcaloidales ácido y básico se aislaron los alcaloides: aspidolimina, aspidoscarpina, 14, 15- dihidroalalakina, 19,20-dihidro-11-metoxi-(+)-limatina, 19,20-dihidro-11-metoxi-(+)-limatinina, aspidolimidina, rhazinilam.

La estructura química de estos alcaloides se determinaron mediante 1 dato físico: actividad óptica y datos espectroscópicos: EM, IR, RMN ^1H y RMN ^{13}C .

La estructura de los alcaloides se determinaron haciendo uso de las correlaciones: Homo y Hetero nucleares: HSQC y HMBC y las correlaciones escalares y espaciales COSY y NOESY.

3.5.1 ASPIDOLIMINA (1)

Alcaloide aislado como sólido amorfo (40,5 mg);

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 115.0$ (c , 0,090, CHCl_3).

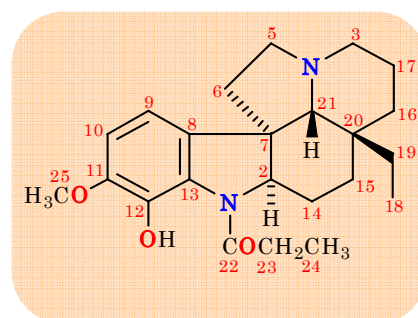
IR (CHCl_3) $\nu_{\text{máx. cm}^{-1}}$: 2937, 1631, 1598, 1580, 1462, 1381, 1250, 1220, 1138, 1064, 725 cm^{-1}

UV (EtOH) $\lambda_{\text{máx. (log } \epsilon)}$: 228 (4.28) y 263 (3.88) nm.

EM de baja resolución, m/z (int. rel., %): 384 (68), 383 (35), 356 (7), 355 (10), 328 (7), 327 (7), 300 (4), 202 (3), 190 (4), 176 (5), 154 (15), 125 (24), 124 (100), 57 (14).

EM de alta resolución, m/z : $[\text{M}]^+$ 384.2406 calculado para un $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_3$.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ_{H} 4.08 (1H, dd, $J = 6.2, 11.4$ Hz, H-2 α), 3.02 (1H, br d, $J = 10.9$ Hz, H-3 α), 1.95 (1H, m, H-3 β), 3.08 (1H, dddd, $J = 2.7, 9.1, 9.1$ Hz, H-5 α), 2.23 (1H, m, H-5 β), 2.00 (1H, m, H-6 α), 1.55 (1H, m, H-6 β), 6.58 (1H, d, $J = 8.1$, H-9), 6.66 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-10), 1.69 (1H, dt, $J = , 13.0$ Hz, H-14 α), 1.52 (1H, m, H-14 β), 1.61 (1H, br d, $J = 14.6$ Hz, H-15 α), 1.08 (1H, m, H-15 β), 1.92 (1H, m, H-16 α),



1.10 (1H, m, H-16 β), 1.69 (1H, dt, $J = 13.0$ Hz, H-17 α), 1.52 (1H, m, H-17 β), 0.61 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-18), 1.34 (1H, dq, 7.4 Hz, H-19), 0.84 (1H, dq, $J = 7.4$ Hz, H-19), 2.21 (1H, s, H-21 β), 2.48-2.55 (2H, dq, $J = 7.5$ Hz, H-23), 1.24 (3H, t, 7.5 Hz, H-24), 3.85 (3H, s, H-25), 10.9 (1H, s, OH).

RMN de ^{13}C (400 MHz, CDCl_3): δ_{C} 69.2 (d, C-2), 53.7 (t, C-3), 52.4 (t, C-5), 39.3 (t, C-6), 52.1 (s, C-7), 133.0 (s, C-8), 112.3 (d, C-9), 110.0 (d, C-10), 149.4 (s, C-11), 137.6 (s, C-12), 127.7 (s, C-13), 25.3 (t, C-14), 34.0 (t, C-15), 23.0 (t, C-16), 21.5 (t, C-17), 6.7 (q, C-18), 30.0 (t, C-19), 35.5 (s, C-20), 70.6 (d, C-21), 172.8 (s, C-22), 28.0 (t, C-23), 9.8 (q, C-24), 56.5 (q, C-25).

3.5.2 ASPIDOCARPINA (2)

Alcaloide aislado como sólido amorfo (58,7 mg.);

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 123.2$ (c, 0.084, CHCl_3).

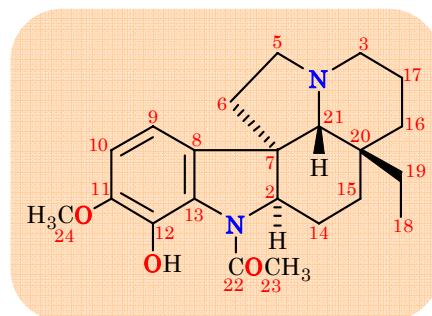
IR (CHCl_3) $\nu_{\text{máx.}}$ cm^{-1} : 3015, 2936, 1631, 1600, 1580, 1464, 1389, 1250, 1082 y 753 cm^{-1}

UV (EtOH) $\lambda_{\text{máx.}}$ (log ϵ): 227 (4.31), 263 (3.89) y 293 (3.33) nm.

EM de baja resolución, m/z (int. rel., %): 370 (33), 342 (5), 341 (3), 327 (2), 152 (6), 124 (100), 86 (5), 84 (8), 55 (5).

EM de alta resolución, m/z : $[\text{M}]^+$ 370.2256 calculado para un $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3$.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ_{H} 4.02 (1H, dd, $J = 6.2, 11.2$ Hz, H-2 α), 3.01 (1H, br d, $J = 10.5$ Hz, H-3 α), 1.95 (1H, m, H-3 β), 3.09 (1H, t, $J = 8.7$ Hz, H-5 α), 2.23 (1H, m, H-5 β), 1.63 (1H, m, H-6 α), 1.52 (1H, m, H-6 β), 6.58 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-9), 6.66 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-10), 1.82 (1H, m, H-14 α), 1.50 (1H, m, H-14 β), 1.98 (1H, br d, $J = 14.6$ Hz, H-15 α), 1.06 (1H, m, H-15 β), 1.63 (1H, m, H-16 α), 1.18 (1H, m, H-16 β), 1.68 (1H, m, H-17 α), 1.50 (1H, m, H-17 β), 0.60 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-18), 1.35 (1H, dq, $J = 7.5$ Hz, H-19A), 0.83 (1H, dq, $J = 7.5$ Hz, H-19B), 2.20 (1H, s, H-21 β), 2.28 (3H, s, H-23), 3.84 (3H, s, H-24).



RMN de ^{13}C (400 MHz, CDCl_3): δ_{C} 70.2 (d, C-2), 53.6 (t, C-3), 52.4 (t, C-5), 39.3 (t, C-6), 52.1 (s, C-7), 112.3 (s, C-8), 110.0 (d, C-9), 108.4 (d, C-10), 149. (s, C-11), 137.5 (s, C-12), 127.5 (s, C-13), 25.0 (t, C-14), 22.9 (t, C-15), 33.9 (t, C-16), 21.4 (t, C-17), 6.7 (q, C-18), 30.0 (t, C-19), 35.4 (s, C-20), 70.6 (d, C-21), 169.2 (s, C-22), 22.62 (q, C-23), 56.4 (q, C-24).

3.5.3 14, 15- DEHIDROALALAKINA (3)

Alcaloide aislado como sólido amorfo (23,9 mg.);

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 60.0$ (c, 0.16, CHCl_3)

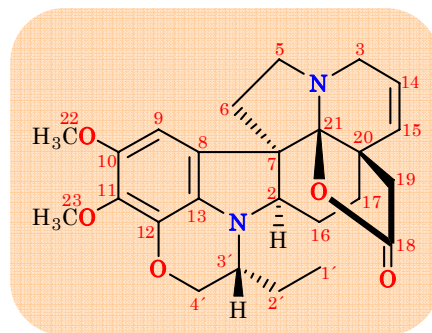
IR (CHCl_3) $\nu_{\text{máx.}}$ cm^{-1} : 3023, 2942, 1753, 1632, 1482, 1453, 1219 y 760 cm^{-1}

EM de baja resolución, m/z (int. rel., %): 438 (100), 423 (10), 409 (19), 394 (13), 380 (20), 379 (72), 365 (12), 351 (8), 335 (5), 273 (10), 260 (7), 236 (9), 219 (7), 182 (7), 172 (20), 158 (43), 55 (8).

EM de alta resolución, m/z : $[M]^+$ 438.2155 (100) calculado para un $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5$.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ_{H} 3.49 (1H, *dd*, $J = 3.9, 11.1 \text{ Hz}$, H-2 α), 3.44 (1H, *dt*, $J = 2.2, 17.0 \text{ Hz}$, H-3 α), 3.37 (1H, *dddd*, $J = 2.0, 4.3, 16.8 \text{ Hz}$, H-3 β), 3.25 (1H, *m*, H-5 α), 3.04 (1H, *m*, H-5 β), 2.51 (1H, *m*, H-6 α), 1.98 (1H, *m*, H-6 β), 6.63 (1H, *s*, H-9), 5.79 (1H, *ddd*, $J = 2.0, 4.3, 9.9 \text{ Hz}$, H-14), 5.34 (1H, *dt*, $J = 2.1, 9.9 \text{ Hz}$, H-15), 1.71 (1H, *m*, H-16 α), 1.45 (1H, *m*, H-16 β), 1.55 (1H, *m*, H-17 α), 1.73 (1H, *m*, H-17 β), 2.48 (1H, *d*, $J = 16.4 \text{ Hz}$, H-19 α), 2.07 (1H, *d*, $J = 16.4 \text{ Hz}$, H-19 β), 3.73 (3H, *s*, H-22), 3.85 (3H, *s*, H-23), 0.97 (1H, *t*, $J = 7.6 \text{ Hz}$, H-1'), 1.47 (1H, *m*, H-2'A), 1.71 (1H, *m*, H-2'B), 3.12 (1H, *m*, H-3'), 4.34 (1H, *dd*, $J = 2.8, 10.8 \text{ Hz}$, H-4' α), 3.99 (1H, *dd*, $J = 8.6, 10.8 \text{ Hz}$, H-4' β).

RMN de ^{13}C (400 MHz, CDCl_3): δ_{C} 68.3 (d, C-2), 45.3 (t, C-3), 49.1 (t, C-5), 33.5 (t, C-6), 59.8 (s, C-7), 124.7 (s, C-8), 101.8 (d, C-9), 147.0 (s, C-10), 136.2 (s, C-11), 135.9 (s, C-12), 130.9 (s, C-13), 123.5 (d, C-14), 130.8 (d, C-15), 18.8 (t, C-16), 28.2 (t, C-17), 175.0 (s, C-18), 40.1 (t, C-19), 43.8 (s, C-20), 106.7 (s, C-21), 56.7 (q, C-22), 60.9 (q, C-23), 9.2 (q, C-1'), 18.9 (t, C-2'), 50.8 (d, C-3'), 69.9 (t, C-4').



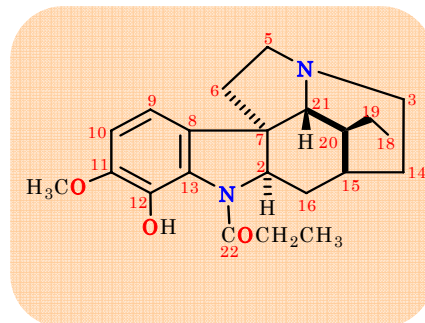
3.5.4 19,20-DIHIDRO-11-METOXI-(+)-LIMATINA (4)

Alcaloide aislado como resina (50,1mg.);

$[\alpha]_D^{25} + 63.5$ (*c*, 1.12, CHCl₃).

IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx.}}$ cm^{-1} : 3330, 2927, 1731, 1632, 1579, 1460, 1381, 1252, 1066 y 753 cm^{-1} .

EM de baja resolución, m/z (int. rel., %): 370 (14), 329 (5), 314 (5), 270 (4), 245 (5), 190 (7), 176 (38), 138 (100), 86 (6), 84 (7).



EM de alta resolución, m/z : $[M]^+$ 370.2256 calculado para un C₂₂H₃₀N₂O₃.

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ_H 4.23 (1H, *t*, *J* = 8.8 Hz, H-2 α), 3.06 (1H, *m*, H-3 β), 2.36 (1H, *ddd*, *J* = 4.1, 12.3, 12.3 Hz, H-3 α), 3.09 (1H, *m*, H-5 β), 2.80 (1H, *m*, H-5 α), 1.80 (1H, *m*, H-6 α), 2.30 (1H, *m*, H-6 β), 6.54 (1H, *d*, *J* = 8.2 Hz, H-9), 6.67 (1H, *d*, *J* = 8.2, Hz, H-10), 2.00 (1H, *m*, H-14 α), 1.80 (1H, *m*, H-14 β), 1.87 (1H, *m*, H-15 α), 1.94 (1H, *m*, H-16 α), 1.71 (1H, *m*, H-16 β), 0.70 (3H, *t*, *J* = 7.1 Hz, H-18), 0.90 (1H, *m*, H-19A) 0.78 (1H, *m*, H-19B), 1.91 (1H, *m*, H-20 α), 3.36 (1H, *s*, H-21 β), 2.56 (2H, *m*, H-23), 1.25 (3H, *t*, *J* = 7.4 Hz, H-24), 3.83 (3H, *s*, H-25), 10.90 (1H, *s*, OH).

RMN de ¹³C (400 MHz, CDCl₃) : δ_C 69.3 (*d*, C-2), 48.8 (*t*, C-3), 53.3 (*t*, C-5), 44.8 (*t*, C-6), 49.8 (*s*, C-7), 132.4 (*s*, C-8), 111.9 (*d*, C-9), 110.2 (*d*, C-10), 149.5 (*s*, C-11), 137.2 (*s*, C-12), 127.4 (*s*, C-13), 30.2 (*t*, C-14), 27.6 (*d*, C-15), 30.8 (*t*, C-16), 11.8 (*q*, C-18), 23.8 (*t*, C-19), 39.0 (*d*, C-20), 64.8 (*d*, C-21), 172.8 (*s*, C-22), 27.9 (*t*, C-23), 9.8 (*q*, C-24), 56.5 (*q*, C-25).

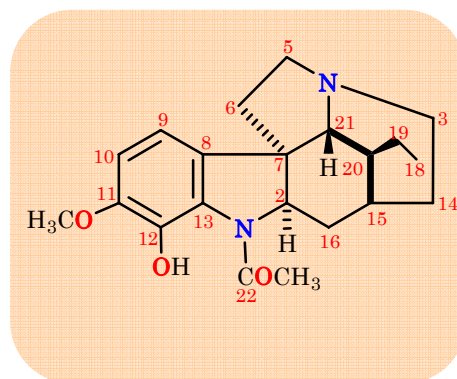
3.5.5 19,20-DIHIDRO-11-METOXI-(+)-LIMATININA (5)

Alcaloide aislado como resina (15,8 mg.);

$[\alpha]_D^{25} + 23.7$ (*c*, 0.04, CHCl₃).

IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx.}}$ cm^{-1} : 2966, 1625, 1595, 1462, 1390, 1255, 1084 cm^{-1}

EM de baja resolución, m/z (int. rel., %): 356 (22), 315 (3), 300 (3), 270 (11), 231 (2), 190 (4), 176 (3), 161 (2), 139 (11), 138 (100), 124 (2), 110 (7), 95 (3), 82 (6), 67 (3), 55 (7).



EM de alta resolución, m/z : $[M]^+$ 356.2100 calculado para un $C_{21}H_{28}N_2O_3$.

RMN de 1H (500 MHz, $CDCl_3$): δ_H 4.23 (1H, *dd*, $J = 8.2, 10.4$ Hz, H-2 α), 3.26 (1H, *m*, H-3 α), 2.46 (1H, *m*, H-3 β), 3.24 (1H, *m*, H-5 α), 2.46 (1H, *m*, H-5 β), 1.94 (1H, *m*, H-6 α), 2.00 (1H, *m*, H-6 β), 6.60 (1H, *d*, $J = 8.2$ Hz, H-9), 6.72 (1H, *d*, $J = 8.2$ Hz, H-10), 2.02 (1H, *m*, H-14 α), 1.75 (1H, *m*, H-14 β), 2.01 (1H, *m*, H-15), 1.94 (1H, *m*, H-16 α), 1.74 (1H, *m*, H-16 β), 0.74 (3H, *t*, $J = 7.3$ Hz, H-18), 0.97 (1H, *m*, H-19A) 0.83 (1H, *m*, H-19B), 1.93 (1H, *m*, H-20 α), 3.52 (1H, *br s*, H-21 β), 2.38 (3H, *s*, H-23), 3.87 (3H, *s*, H-24), 10.80 (1H, *s*, OH)

RMN de ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$): δ_C 70.4 (*d*, C-2), 48.7 (*t*, C-3), 52.3 (*t*, C-5), 44.6 (*t*, C-6), 49.8 (*s*, C-7), 132.0 (*s*, C-8), 112.4 (*d*, C-9), 110.3 (*d*, C-10), 149.7 (*s*, C-11), 137.3 (*s*, C-12), 127.2 (*s*, C-13), 30.5 (*t*, C-14), 27.4 (*d*, C-15), 30.1 (*t*, C-16), 11.8 (*q*, C-18), 23.7 (*t*, C-19), 38.9 (*d*, C-20), 64.8 (*d*, C-21), 169.3 (*s*, C-22), 22.7 (*q*, C-23), 56.5 (*q*, C-24).

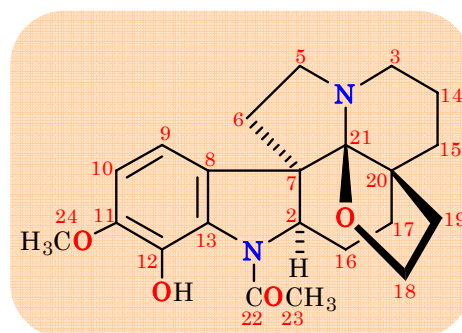
3.5.6 ASPIDOLIMIDINA (6)

Alcaloide aislado como resina (91,6mg.);

$[\alpha]_D^{25} + 106.3$ (*c*, 0.064, $CHCl_3$).

IR ($CHCl_3$) ν_{max} . cm^{-1} : 2934, 1630, 1598, 1459, 1384, 1252, 1079 y 752 cm^{-1}

UV (EtOH) λ_{max} . (log ϵ): 226 (4.26), 261 (3.78) y 295 (3.28) nm.



EM de baja resolución, m/z (int. rel., %): 384 (38), 383 (14), 357 (10), 356 (42), 354 (14), 341 (13), 340 (42), 339 (30), 311 (5), 297 (4), 190 (6), 180 (6), 182 (20), 176 (6), 161 (10), 160 (22), 146 (4), 139 (9), 138 (100), 125 (5), 122 (6), 81 (6), 69 (6), 57 (7), 55 (8).

EM de alta resolución, m/z : $[M]^+$ 384.2045 calculado para un $C_{22}H_{28}N_2O_4$,

RMN de 1H (500 MHz, $CDCl_3$): δ_H 3.90 (1H, *dd*, $J = 6-4, 11.8$ Hz, H-2 α), 2.78 (1H, *t*, $J = 6.8$ Hz, H-3), 2.64 (1H, *m*, H-3), 3.05 (1H, *m*, H-5), 2.96 (1H, *m*, H-5), (2H, *m*, H-

6), 7.02 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-9), 6.87 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-10), (1H, ddd, $J = 13.1$, 11.9, 5.0 Hz, H-14 α), (1H, m, H-14 β), (1H, m, H-15 α), (2H, m, H-16), (1H, m, H-17), (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-17), 4.20 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-18), 4.07 (1H, m, H-19), (1H, q, $J = 6.6$ Hz, H-19 β), 2.29 (3H, s, H-23), 3.86 (3H, s, H-24), 10.7 (1H, s, OH).

RMN de ^{13}C (400 MHz, CDCl_3): δ_{C} 70.7 (d, C-2), 43.9 (t, C-3), 48.7 (t, C-5), 36.6 (t, C-6), 57.4 (s, C-7), 132.4 (s, C-8), 114.6 (d, C-9), 110.3 (d, C-10), 149.5 (s, C-11), 137.0 (s, C-12), 128.0 (s, C-13), 20.9 (t, C-14), 32.9 (t, C-15), 24.8 (t, C-16), 26.4 (t, C-17), 65.2 (t, C-18), 34.5 (t, C-19), 39.7 (s, C-20), 101.7 (s, C-21), 168.9 (s, C-22), 22.9 (q, C-23), 56.4 (q, C-24).

3.5.7 RHAZINILAM (7)

Compuesto aislado como sólido amorfo de color oscuro (4,1mg); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 100$ (c, 0.002, CHCl_3).

IR (CHCl_3) $\nu_{\text{máx.}}$ cm^{-1} : 3216, 2928, 2336, 1670, 1457, 807 y 755 cm^{-1}

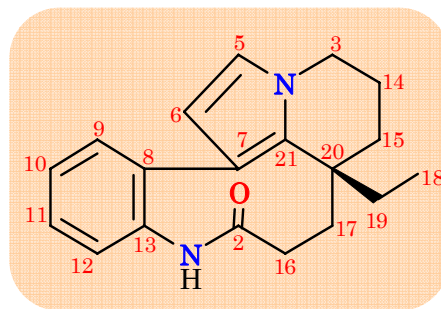
EM de baja resolución, m/z (int. rel., %): 294

(19), 266 (19), 265 (100), 238 (6), 237 (28), 222 (6), 209 (27), 183 (9), 149 (5), 88 (5), 57 (6), 55 (5).

EM de alta resolución, m/z : $[\text{M}]^+$ 294.173 calculado para un $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ_{H} 6.91 (1H, s, N-H), 4.01 (1H, dd, $J = 5.2$, 11.8 Hz, H-3 α), 3.78 (1H, dddd, $J = 4.7$, 12.1, 12.1 Hz, H-3 β), 6.50 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H-5), 5.75 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-6), 7.42 (1H, dd, $J = 1.8$, 7.3 Hz, H-9), 7.30 (1H, ddd, $J = 1.7$, 7.4, 7.4 Hz, H-10), 7.34 (1H, ddd, $J = 1.7$, 7.4, 7.4 Hz, H-11), 7.20 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-12), 2.21 (1H, m, H-14 α), 1.85 (1H, m, H-14 β), 1.55 (1H, dt, $J = 3.2$, 13.0 Hz, H-15 α), 1.72 (1H, ddd, $J = 2.9$, 13.3, 13.3 Hz, H-15 β), 2.38 (1H, t, $J = 13.0$ Hz, H-16 α), 1.99 (1H, dd, $J = 8.4$, 13.5 Hz, H-16 β), 2.45 (1H, t, $J = 12.8$ Hz, H-17 α), 1.29 (1H, m, H-17 β), 0.71 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, H-18), 1.46 (1H, m, H-19A), 1.25 (1H, m, H-19B).

RMN de ^{13}C (400 MHz, CDCl_3): δ_{C} 177.3 (s, C-2), 46.0 (t, C-3), 119.1 (d, C-5), 109.5 (d, C-6), 117.3 (s, C-7), 140.4 (s, C-8), 131.4 (d, C-9), 127.2 (d, C-10), 128.0 (d, C-11),



126.8 (d, C-12), 138.0 (s, C-13), 19.4 (t, C-14), 33.0 (t, C-15), 28.0 (t, C-16), 36.6 (t, C-17), 8.2 (q, C-18), 31.9 (t, C-19), 38.8 (s, C-20), 130.6 (s, C-21).

Figura 11.

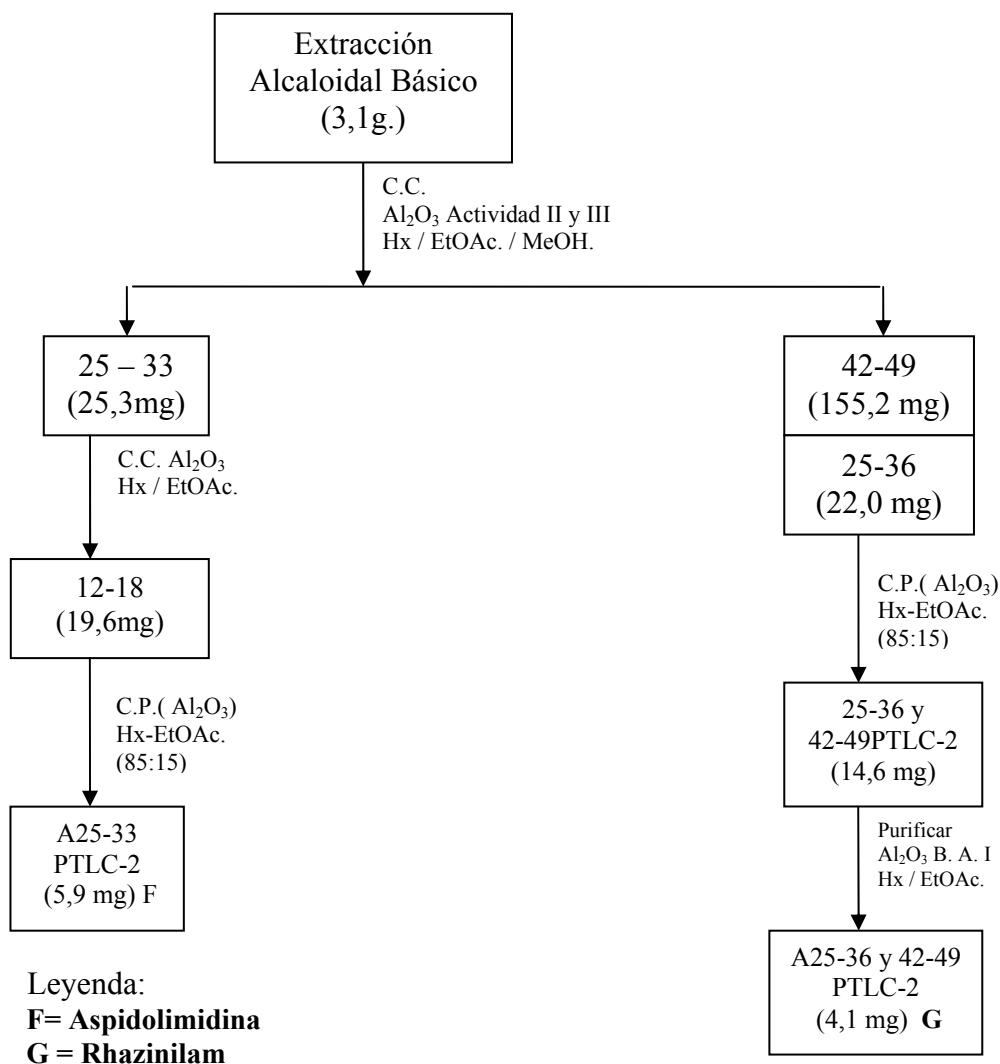


Figura 13. Diagrama de fraccionamiento, aislamiento y purificación de la corteza de raíz de *Aspidosperma desmanthum* del extracto alcaloidal básico.

CAPÍTULO III

1 RESULTADOS Y DISCUSIONES

1.1 RESULTADOS

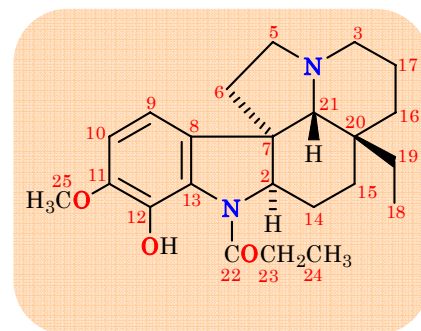
De los extractos alcaloidales ácido (4,56 g) y básico (3,15 g) se aislaron los alcaloides: aspidolimina; aspidoscarpina; 14, 15- dehidroalalakina; 19,20-dihidro-11-metoxi-(+)-limatina; 19,20-dihidro-11-metoxi-(+)-limatinina; aspidolimidina y rhazinilam; de los cuales solo aspidoscarpina presento actividad antiplasmodial *in vitro*: frente *Plasmodium falciparum* cepa referencial FCR-3 cloroquina resistente con una CI_{50} de 7,66 $\mu\text{g/mL}$ y dio negativo al Test de Inhibición de la Ferroprotoporfirina IX (FBIT).

La estructura química de los alcaloides se determinaron mediante la comparación de su actividad óptica, y sus datos espectroscópicos como UV, IR, EM, RMN ^1H y RMN ^{13}C con los publicados en la bibliografía y haciendo uso de las correlaciones Homo nucleares: HSQC y COSY y heteronucleares: HMBC y NOESY.

1.2 DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS ALCALOIDES AISLADOS

1.2.1 ASPIDOLIMINA (1)

Alcaloide del tipo plumerano, aislado como sólido amorfo, de $[\alpha]_D^{25} + 115$ (c, 0.009, CHCl_3). Los espectros de IR y UV muestran bandas de absorción a 1631 (-N-COR), 1598, 1462, 1064 y 725 cm^{-1} y 228 y 263 $\log \epsilon$ (4.28 y 3.88), características de N-acilindolinas. El espectro de masas está estrechamente relacionado con aspidocarpina (2) descrito a continuación, siendo su ión molecular 14 una mayor, debido a la presencia de un grupo (CH_2) adicional en su molécula. Su fórmula molecular fue calculada mediante espectrometría de masas alta resolución como un $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_3$.



Después de un cuidadoso análisis de los espectros de RMN de ^1H (Fig.11) y ^{13}C mono y bidimensional de ambos compuestos, llegamos a la conclusión que se tratan de alcaloides con el mismo esqueleto.

Por otra parte el espectro de RMN de ^1H muestra tres señales a campo bajo, dos se atribuyen a protones aromáticos a δ_{H} 6.58 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-9), δ_{C} 112.3 (d), 6.66

(1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-10), δ_C 110.0 (d) y la tercera a δ_H 10,9 (s) que corresponde a un grupo (OH) bencénico, localizado en C-12. Un singlete a δ_H 3.85 (3H) asignado a un metoxilo, localizado sobre el C-11 por su conectividad observada en un experimento HMBC, así como dos grupos de señales a campo alto; el primero a δ_H 0.61 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-18), δ_C 6.7 (q), 0.84 y 1.34 (1H, cada uno dq, $J = 7.4$ Hz, H-19), δ_C 30.0 (t), atribuibles a un grupo etilo, ubicado sobre el carbono C-20 deducido mediante un experimento HMBC, mientras que el segundo grupo a δ_H 2.4 (2H, dq, $J = 7.5$ Hz, H-23) y 1.24 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-24), debido a la presencia de un grupo (N-CO-CH₂CH₃). De las señales restantes, cuatro se encuentran localizados a δ_H 3.02 (1H, br d, $J = 10.9$ Hz, H-3 α), 1.95 (1H, m, H-3 β), δ_C 53.7 (t) y 3.08 (1H, dddd, $J = 2.7, 9.1, 9.1$ Hz, H-5 α), 2.23 (1H, m, H-5 β), δ_C 52.4 (t), acoplados independientemente entre sí, localizados en los carbonos adyacentes al nitrógeno, siendo sus asignaciones hechas con la ayuda de un experimento NOESY (Fig. 10). Todas estas evidencias espectroscópicas nos ayudaron a establecer la identidad de nuestro alcaloide, al comparar sus datos espectroscópicos con los publicados para *aspidolimina*, aislado previamente de *Aspidosperma limae*⁵⁴ y *A. obscurinervium*.⁵⁵

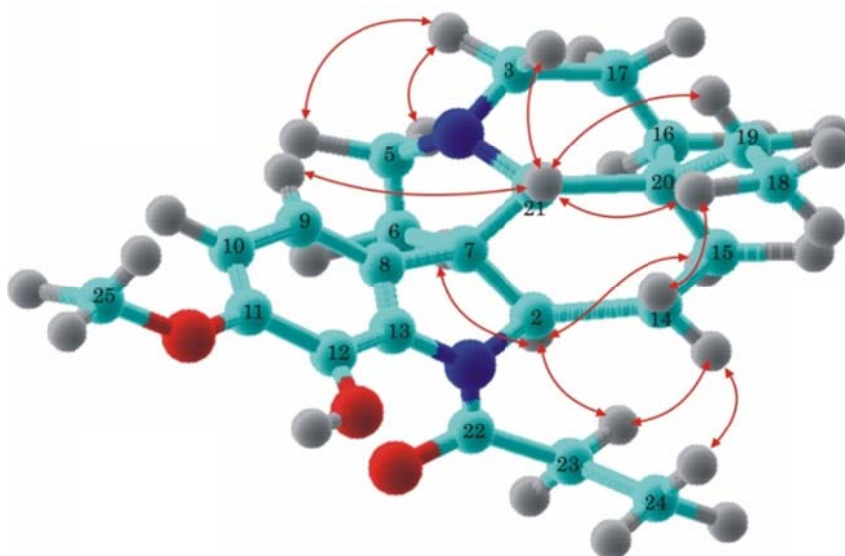


Figura 14. NOESY de aspidolimina.

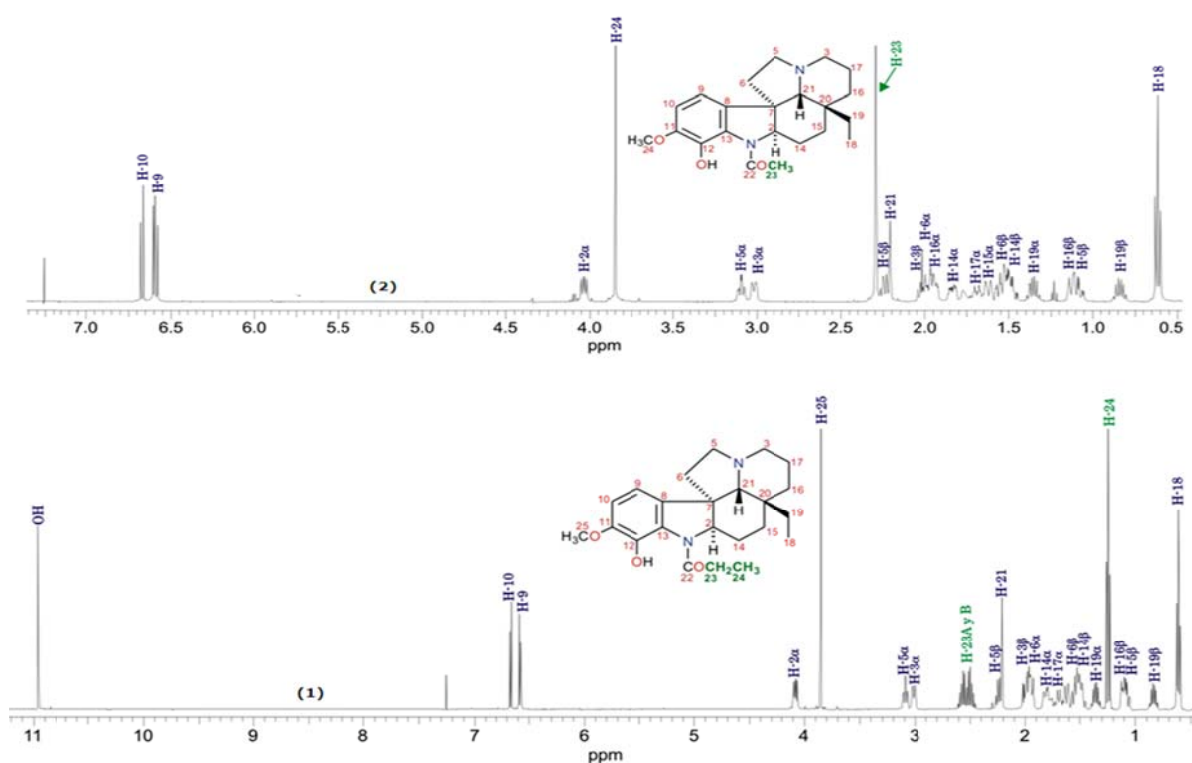
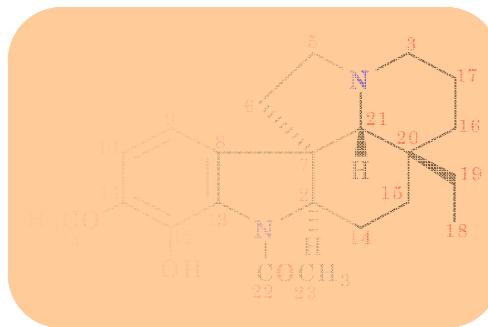


Figura 15. Espectros RMN ^1H de aspidocarpina (2) y aspidolimina (1)

1.2.2 ASPIDOCARPINA (2)

Alcaloide aislado como sólido amorfo de $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +123.2$ (c, 0.084, CHCl_3). Sus espectros IR y UV (EtOH) exhibieron bandas de absorción a 3453 cm^{-1} (OH), una aguda banda de absorción a $1631, 1600$ (N-C=O) y 1580 cm^{-1} y $227, 263$ y 293 nm $\log \epsilon$ (4.31, 3.89 y 3.33) absorciones correspondiente a acilindolinas. El espectro de masas registró su ión molecular a m/z : 370.2247 (33 %), (calculado en un espectrómetro de masas de alta resolución para un $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3$) y fragmentos a m/z : 342 (5 %), 328 (2), 124 (100) que se indica en la Fig. 12.⁵⁶



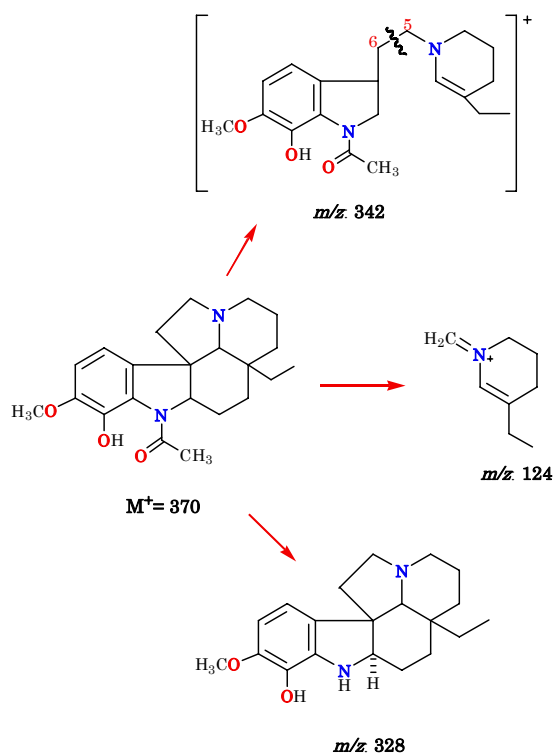
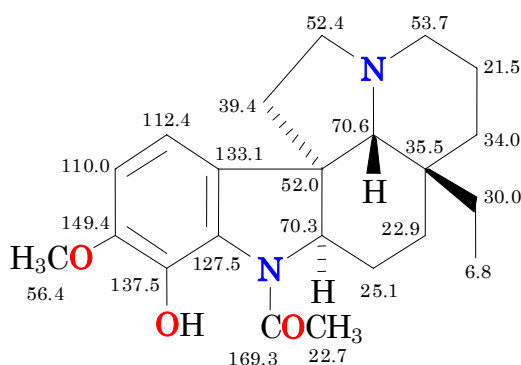
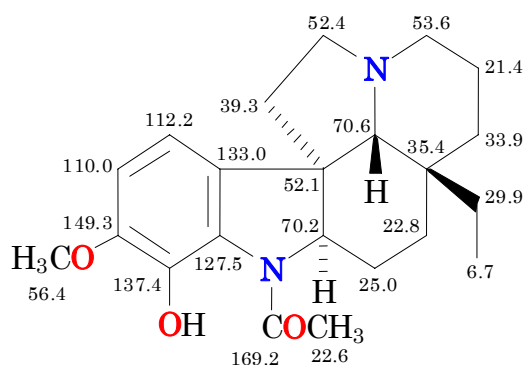


Figura15. Fraccionamiento de masas de aspidocarpina.

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C muestran señales correspondientes a protones aromáticos vecinos a δ_{H} 6.66 (1H, d, $J = 8.2$ Hz) y 6.58 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), correlacionados con sus carbonos a δ_{C} 112.3 (d) y 110.0 (d), una señal a δ_{H} 3.84 (3H, s) a δ_{C} 56.4 (q), atribuible a un grupo metoxilo, así como señales correspondientes a un grupo (N-CO-CH₃) a δ_{H} 2.28 (3H, s); δ_{C} 20.9 (q) y 169.2 (s), un grupo metilo localizado sobre un carbono no protonado a δ_{H} 0.60 (3H, t, $J = 7.5$ Hz), δ_{C} 6.7 (q); 0.83 y 1.35 (1H, cada una, d, $J = 7.5$ Hz), δ_{C} 30.0 (t) y dos pares de protones adyacentes a nitrógeno entre 1.95 y 3.05 ppm, δ_{C} 53.6 (t) y 52.4 (t). Las correlaciones de estos protones con sus respectivos átomos de carbonos se establecieron mediante un experimento HSQC. Estos datos espectroscópicos nos sugirieron una estructura indólica del tipo plumerano, subtipo tabersonina como indica en la Fig. 7. Una vez revisada la bibliografía química fue identificado como aspidocarpina, alcaloide aislado previamente de *Aspidosperma album*,⁵⁷ *A. formosanum*,⁵⁸ *A. limae*,^{54, 59} *A. marcgravianum*,⁶⁰ *A. megalocarpon*,^{61,66} *A. neblinae*,⁶³ *A. oblongum*,⁶⁴ *A. obscurinervium*⁵⁵ y *A. olivaceum*.⁶⁵



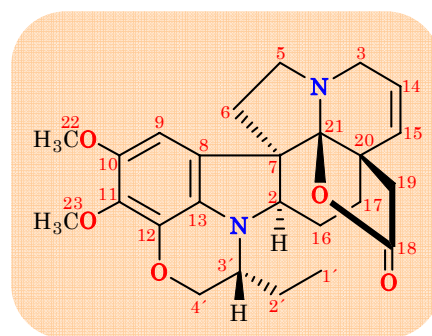
Aspidocarpina



Alcaloide aislado

1.2.3 14, 15- DEHIDROALALAKINA (3)

Alcaloide no descrito en la literatura química, aislado como sólido amorfo, $[\alpha]_D^{25} -60.0$ (c, 0.160, CHCl_3). El espectro de IR muestra bandas de absorción a 3023, 2942, 1753 cm^{-1} , atribuible a una lactona ciclopentánica del tipo 18-oxo-metilaspidoalbina⁶⁶, 1482 cm^{-1} vibraciones de deformación (C-H), 1453 cm^{-1} vibraciones de deformación (C-H), 1219 cm^{-1} vibraciones de tensión (C-O) y 760 cm^{-1} . Su espectro de masas, muestra un pico para su ión molecular a m/z: 438 (100 %), así como fragmentos a m/z: 423 (10) $[\text{M}^+ - \text{CH}_3]$, 409 (19) $[\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{CH}_3]$, 394 (13) $[\text{M}^+ - \text{CO}_2]$, 380 (20), 379 (72) y 158 (43), los cuales fueron tomados teniendo en cuenta la intensidad de los picos.



A campo bajo en el espectro de RMN de ^1H (tabla 01), se observa una señal a δ_{H} 6.63 (1H, s), asignada al protón H-9 mediante un experimento HMBC, por las correlaciones observadas con los carbonos cuaternarios a δ_{C} 59.8 (s, C-7), 124.7 (s, C-8), 147.0 (s, C-10), 136.2 (s, C-11) y 130.9 (s, C-13). Esta señal se correlaciona con su carbono a δ_{C} 101.8. Además, se observan tres metilos a δ_{H} 3.85 (3H, s, H-23), 3.73 (3H, s, H-22) y 0.97 (3H, t, J = 7.6 Hz, H-1'), los cuales están conectados a sus carbonos a δ_{C} 60.9 (q, C-23), 56.7 (q, C-22) y 9.2 (q, C-1') mediante un experimento HSQC, respectivamente,

que nos indica la presencia de dos grupos OMe y un metilo sobre carbono secundario en la molécula.

También exhibe un multiplete que integra para un protón a δ_H 3.12 ppm, que muestra un acoplamiento escalar (COSY) con las señales a δ_H 4.34 (1H, dd, $J = 2.8, 10.8$ Hz, H-4' α), 3.99 (1H, dd, 8.6, 10.8 Hz, H-4' β), 1.47 (1H, m, H-2'A) y 1.71 (1H, m, H-2'B). Estas señales a su vez están conectadas con sus carbonos a δ_C 50.8 (d, C-3'), 69.9 (t, C-4') y 18.9 (t, C-2'), en un experimento HSQC. Además, la señal del metilo a δ_H 0.97 (3H, t) presenta acoplamiento (COSY, HSQC) con las correspondientes señales a δ_H 1.47 (m) y 1.71 (m); δ_C 18.9 (t, C-2'), y nos permite asignar el multiplete a δ_H 3.12 ppm, al protón H-3' y nos sugiere la presencia de un grupo etilo localizado sobre el carbono 3', confirmado mediante un experimento HMBC.

La señal que aparece como doble doblete a δ_H 3.49 ($J = 3.9, 11.1$ Hz), δ_C 68.3 (d, C-2), atribuible al protón sobre carbono "α" nitrógeno, presenta acoplamiento homonuclear (COSY) con dos protones adyacentes a δ_H 1.71 (1H, m, H-16 α) y 1.45 (1H, m, H-16 β), δ_C 22.3 (t, C-16) y conectividades a tres enlaces con los carbonos cuaternarios a δ_C 124.7 (s, C-8), 130.9 (s, C-13) y el carbono metilénico a δ_C 28.2 (t, C-17).

En el espectro de RMN de 1H se observan dos señales correspondientes a protones vinílicos a δ_H 5.79 (1H, ddd, $J = 2.0, 4.3, 9.9$ Hz) y 5.34 (1H, dt, $J = 2.1, 9.9$ Hz). El primero posee conectividad con el carbono C-20 y el segundo con los carbonos C-19, C-20 y C-21, en un experimento HMBC por lo que son asignados a los protones H-14 y H-15, respectivamente. Así mismo, se observan dos señales a δ_H 2.48 y 2.07 (1H cada una, d, $J = 16.4$ Hz) de un sistema AB, que están correlacionadas con su carbono a δ_C 40.1 (t) mediante un experimento HSQC. Estas señales presentan conectividades a dos y tres enlaces con los carbonos C-15, C-17, C-18, C-20 y C-21, que nos permite asignarlas a los protones del carbono 19.

Las restantes señales de los protones y carbonos, se establecieron mediante los datos obtenidos de los experimentos de RMN bidimensionales, 1H -COSY, NOESY, HSQC y HMBC (tabla 04), los cuales están de acuerdo con la estructura propuesta para nuestro alcaloide. Finalmente la estructura de nuestro alcaloide fue establecida mediante

experimento NOESY (Fig. 13). Este compuesto esta estrechamente relacionado con el alcaloide dihidroindólico alalakina, aislado previamente de *Aspidosperma album*⁶⁷, excepto porque en nuestro alcaloide presenta una insaturación entre los carbonos 14 y 15, por lo que a nuestro producto lo denominados 14,15-dehidroalalakina.

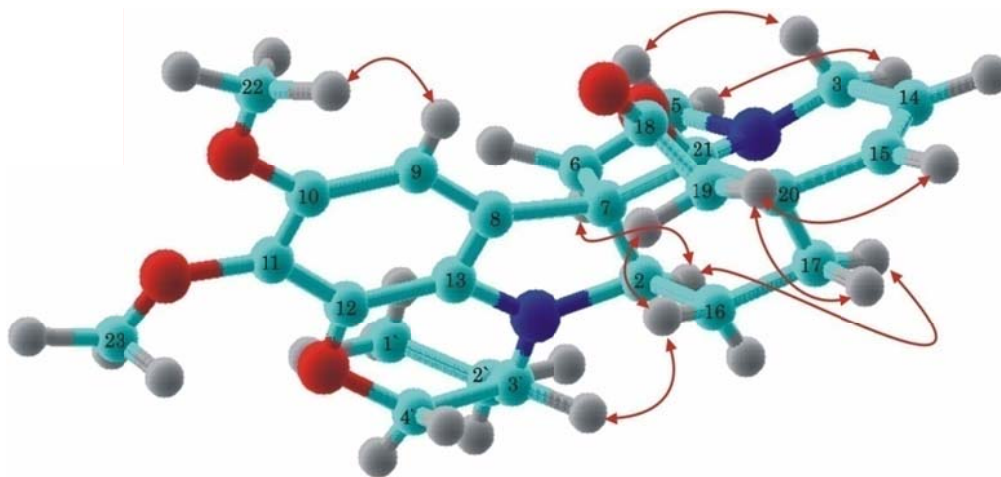


Figura 16. NOESY de 14,15-dehidroalalakina (3).

Tabla 01. Datos de RMN ^1H , HSQC y HMBC de 14,15-dehidroalalakina (3).

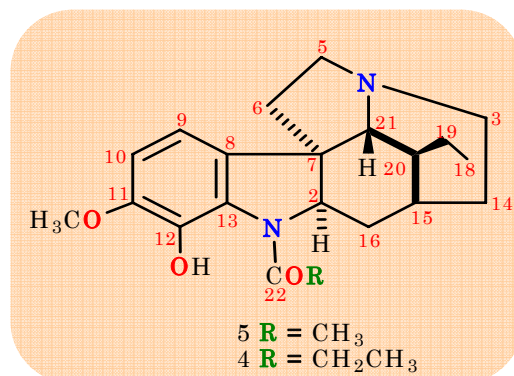
| Protón | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ | HSQC ^b | HMBC |
|-------------|--------------------------------|-------------------|-----------------------|
| 2 α | <i>dd</i> (3.9, 11.1) | 68.3(d) | C-13, C-17 |
| 3 α | <i>dt</i> (2.2, 17.0) | 45.3(t) | , C-15 |
| 3 β | <i>dddd</i> (2.0, 4.3, 16.8) | 45.3(t) | , C-15 |
| 5 α | <i>m</i> | 49.1(t) | |
| 5 β | <i>m</i> | 49.1(t) | C-7 |
| 6 α | <i>m</i> | 33.5(t) | C-5, C-7, C-21 |
| 6 β | <i>m</i> | 33.5(t) | |
| 7 | | 59.8(s) | |
| 8 | | 124.7(s) | |
| 9 | <i>s</i> | 101.8(d) | C-8, C-10, C-11, C-13 |
| 10 | | 147.0(s) | |
| 11 | | 136.2(s) | |
| 12 | | 135.9(s) | |
| 13 | | 130.9(s) | |
| 14 | <i>ddd</i> (2.0, 4.3, 9.9) | 123.5(d) | |
| 15 | <i>dt</i> (2.1, 9.9) | 130.8(d) | , C-20, C-21 |
| 16 α | <i>m</i> | 18.8(t) | C-7, C-17 |
| 16 β | <i>m</i> | 18.8(t) | C-17 |
| 17 α | <i>m</i> | 28.2(t) | C-16, C-19 |
| 17 β | <i>m</i> | 28.2(t) | C-16, C-21 |
| 18 | | 175.0(s) | |
| 19 α | <i>d</i> (16.4) | 40.1(t) | , C-17, C-18, C-20 |
| 19 β | <i>d</i> (16.4) | 40.1(t) | , C-18, C-20, C-21 |
| 20 | | 43.8(s) | |
| 21 | | 106.7(s) | |
| 22 | <i>s</i> | 56.7(q) | |
| 23 | | 60.9(q) | |
| 1' | <i>t</i> (7.6) | 9.2(q) | , C-1' |
| 2'A | <i>m</i> | 18.9(t) | , C-4', C-1' |
| 2'B | <i>m</i> | 18.9(t) | , C-4', C-1 |
| 3' β | <i>m</i> | 50.8(d) | , C-1' |
| 4' α | <i>dd</i> (2.8, 10.8) | 69.9(t) | |
| 4' β | <i>dd</i> (8.6, 10.8) | 69.9(t) | |

a Entre paréntesis, las constantes de acoplamiento H-H en Hz.

b Las multiplicidades de RMN de ^{13}C fueron establecidas mediante experimento DEPT.

1.2.4 19,20-DIHIIDRO-11-METOXI-(+)-LIMATINA (4) y 19,20-DIHIIDRO-11-METOXI-(+)-LIMATININA (5)

Estos dos alcaloides fueron aislados como resina, $[\alpha]_D^{25} +23.7$ (c , 0.04, CHCl_3) y $[\alpha]_D^{25} +63.5$ (c , 1.12, CHCl_3), respectivamente. Sus espectros de IR presentaron bandas de absorción a 1625 y 1595 (N-CO). Mediante el análisis de sus datos espectroscópicos (RMN de ^{13}C) y espectrométricos se dedujeron sus fórmulas moleculares. Estos alcaloides presentaron un ión molecular a m/z 356 (22%) y m/z 370 (14%) calculados para un $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3$ y $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3$ mediante espectrometría de masas de alta resolución, respectivamente.



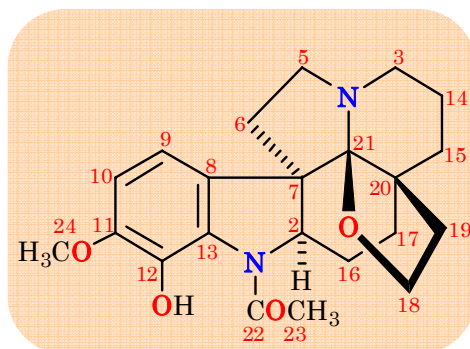
Los espectros de RMN de ^1H (Fig. 14) y ^{13}C de estos $\text{>N}-\text{C}=\text{H}$ alcaloides están estrechamente relacionados; 4 dio señales para un grupo etilo a δ_{H} 0.70 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), δ_{C} 11.8 (q); δ_{H} 0.78 y 0.90 (1H cada una, m), δ_{C} 23.8 (t), un conjunto de señales atribuibles a un agrupamiento $\text{N-CO-CH}_2\text{CH}_3$ a δ_{H} 1.25 (3H, t, $J = 7.4$ Hz), δ_{C} 9.8 (q); δ_{H} 2.56 (2H, m), δ_{C} 27.9 (t) y δ_{C} 172.8 (s), un singlete a δ_{H} 3.83 (s, 3H), δ_{C} 56.5 (q) asignable a un grupo metoxilo en el anillo aromático, tres señales a campo bajo a δ_{H} 6.54 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), δ_{C} 111.9 (d), δ_{H} 6.67 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), δ_{C} 110.2 (d) y un singlete a δ_{H} 10.88 (1H, OH) característico de un hidroxilo fenólico localizado en C-12 por su conectividad a dos y tres enlaces con C-12 y C-11 en un experimento HMBC. La evidencia de estos datos espectroscópicos y la comparación de éstos con los publicados para el alcaloide 11-metoxilimatina⁶⁸ nos permitió deducir que nuestro alcaloide posee la misma estructura indólica (tipo aspidospermatano) excepto por la ausencia de la insaturación entre C-19 y C-20, encontrándose el radical etilo en su lugar, evidencia espectroscópica que se deduce tras un cuidadoso análisis del experimento HMBC, en el que se establecen las correlaciones a larga distancia entre los desplazamientos químicos del grupo etilo δ_{H} 0.70 (t), 0.78 y 0.90 (m) con los carbonos C-15, y C-20. El carbono C-21 porta un protón con un desplazamiento singular a δ_{H} 3.36 (s, 1H), δ_{C} 64.8 (d), (adyacente a nitrógeno), dicho protón presenta conectividades con los carbonos a δ_{C} 27.6 (d, C-15), 39.0 (d, C-20), 48.8 (t, C-3), 69.3 (d, C-2) y 132.4 (s, C-8). La estereoquímica relativa de este compuesto se determinó mediante el análisis

de un experimento NOESY, observándose las siguientes correlaciones espaciales: la señal a δ_H 4.23 (H, t, H-2) presentó un efecto NOE con la correspondiente al protón H-6 α (2.30, m), H-3 α (3.06, m) y H-23 (2.56, m) y el singlete a δ_H 3.36 (1H, s, H-21) con los protones H-18, H-19A, y H-9. Esta disposición espacial sólo es explicable con la estructura propuesta en la figura 45. Una completa asignación de los datos de RMN de 1H y ^{13}C se presenta en la tabla 18. Por tanto, la estructura de nuestro compuesto quedó establecida como 19,20-dihidro-11-metoxi-(+)-limatina, un alcaloide indólico, tipo aspidospermatano, que no ha sido descrito previamente en la bibliografía química. El alcaloide **5**, está estrechamente relacionado con **4**, pues se trata del 19,20-dihidro-11-metoxi-(+)-limatinina como se deduce del estudio de los datos RMN de 1H y ^{13}C , donde no se observan las señales características del grupo N-CO-CH₂CH₃ y en su lugar aparecen las correspondientes a un grupo N-CO-CH₃: a δ_H 2.38 (3H, s) δ_C 22.7 (q) y 169.3 (s). Además, su espectro de masas presenta un ión molecular a m/z 356, 14 uma, menor que **4**, de acuerdo para C₂₁H₂₈N₂O₃ obtenido mediante espectrometría de masas de alta resolución. Este alcaloide tampoco ha sido descrito como producto natural en la bibliografía química, pero sí como producto de hidrogenación de 11-metoxi-(+)-limatinina, donde sólo se publica su punto de fusión y el espectro de masas en baja resolución.⁶⁹

1.2.5 ASPIDOLIMIDINA (6)

Alcaloide aislado como resina, de $[\alpha]_D^{25} +106.3$ (c, 0.064, CHCl₃). Su espectro de IR mostró bandas de absorción características de un grupo acilindolina a 1630, 1598 cm⁻¹ y 755 cm⁻¹ que corresponde a la vibración de C-H del anillo aromático; su espectro de UV (EtOH) presentó bandas de absorción a 226, 261 y 295 nm, log ϵ (4.26, 3.78 y 3.28).

El espectro de masas dio un ión molecular a m/z : 384 (38%), medido mediante espectrometría de masas de alta resolución, $[M]^+$ 384.2038, calculado para un C₁₉H₂₂N₂O, así como fragmentos a m/z : 357 (10), 356 (42), 341 (13), 340 (43), 339 (30), 182 (20), 160 (22) y a m/z 138 (100%) que corresponde a su pico base.



El espectro RMN de ^1H , estrechamente relacionado con el RMN de ^1H del alcaloide haplocidina (Fig. 14), aislado de *A. rigidum* la diferencia existente entre ambos, proviene de la presencia de tres señales a campo bajo, en lugar de cuatro, como se observa en haplocidina y un singlete a δ_{H} 3.86 (3H), δ_{C} 56.4 (q, C-24), que corresponde un grupo metoxilo. Las dos primeras a δ_{H} 7.02 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-9) y 6.87 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-10), se correlacionan con sus respectivos carbonos mediante un experimento HSQC a δ_{C} 114.6 (d, C-9) y 110.3 (d, C-10). La tercera señal a δ_{H} 10.7 (1H, s) es asignada a un grupo hidroxilo, localizado sobre el anillo aromático a δ_{C} 137.0 (s, C-12), mediante un experimento HMBC. Teniendo en cuenta la evidencia de los datos espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C y las correlaciones observadas en los experimentos bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC), nuestro alcaloide ha sido identificado como aspidolimidina, aislado previamente de *A. album*,⁵⁶ *A. limae*,⁵⁴ *A. marcgravianum*³² y *A. megalocarpon*.⁶²

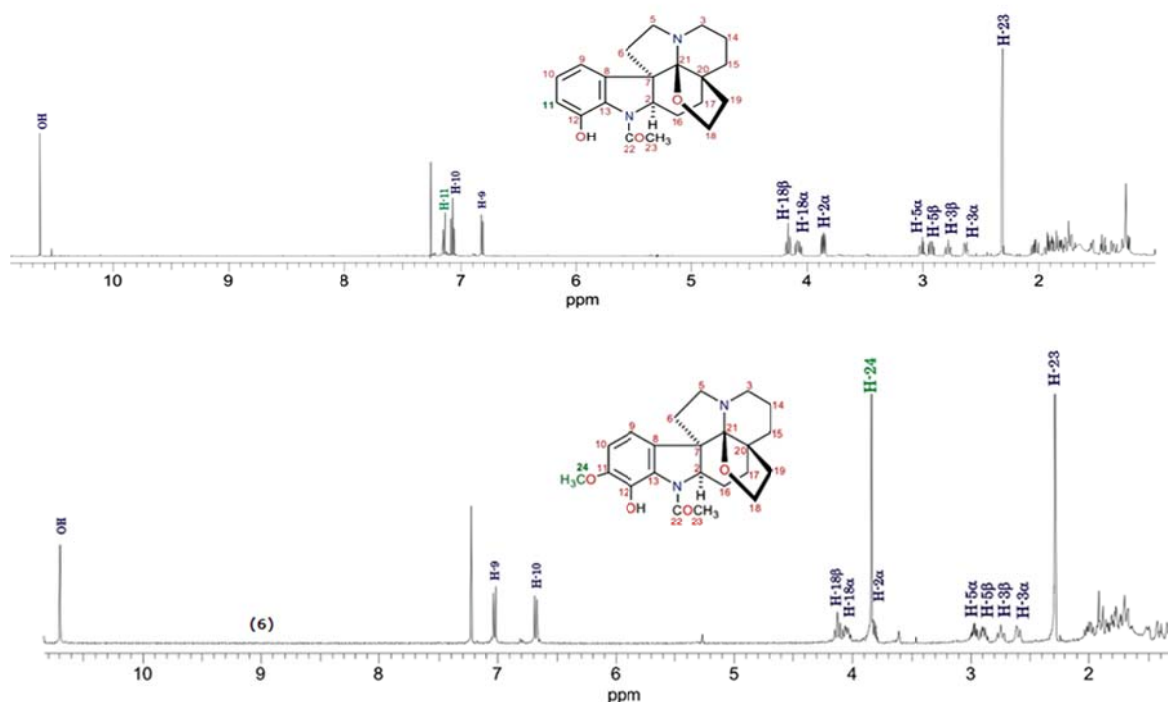
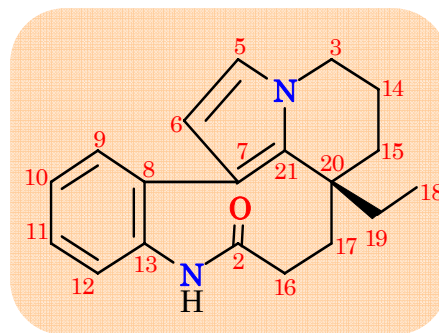


Figura 17. Espectros RMN ^1H de haplocidina y aspidolimidina (6)

1.2.6 RHAZINILAM (7)

Alcaloide aislado como sólido amorfo de color oscuro, de $[\alpha]_D^{25} - 100$ (c, 0.002, CHCl_3). Su espectro de IR mostró bandas de absorción de un grupo lactama a 3216 , 1670 cm^{-1} y a 755 cm^{-1} , absorción que corresponde a la vibración de C-H del anillo aromático. Su espectro de masas dio un ión molecular a m/z 294 (19%) (EM de alta resolución, m/z 294.1733, calculado para un $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$; 294.1732), así como la pérdida de un sustituyente a m/z : 265 (100 %) que corresponde a un grupo etilo.



En el espectro de RMN de ^1H (Fig. 15), se observan siete señales a campo bajo, cinco de ellas a δ_{H} 7.42 (1H, dd, $J = 1.8, 7.3 \text{ Hz}$, H-9), 7.30 (1H, ddd, $J = 1.7, 7.4, 7.4 \text{ Hz}$, H-10), 7.34 (1H, ddd, $J = 1.7, 7.4, 7.4 \text{ Hz}$, H-11), 7.20 (1H, d, $J = 7.5 \text{ Hz}$, H-12) y 6.91 (1H, s, N-H), son atribuibles al núcleo indólico, las dos señales restantes a δ_{H} 6.50 (1H, d, $J = 2.6 \text{ Hz}$, H-5) y 5.75 (1H, d, $J = 2.5 \text{ Hz}$, H-6), corresponden a un grupo pirrol, que están bien correlacionadas con otros grupos pirrólicos 1, 2, 3-sustituido. El protón vinílico más cercano al átomo de nitrógeno (H-5) es desplazado a campo mas bajo por el anillo y la proximidad al nitrógeno. Estas señales a campo bajo se correlacionan con sus carbonos mediante un experimento HSQC; δ_{C} 131.4 (d, C-9), 127.2 (d, C-10), 128.0 (d, C-11), 126.8 (d, C-12), 119.1 (d, C-5) y 109.5 (d, C-6), respectivamente. Las señales a δ_{H} 4.01 (1H, dd, $J = 5.2, 11.8 \text{ Hz}$) y 3.78 (1H, dddd, $J = 4.7, 12.1, 12.1 \text{ Hz}$), por su proximidad al nitrógeno, son asignadas a los protones del C-3 mediante los experimentos HSQC y HMBC.

Los desplazamientos químicos a δ_{H} 2.38 (t, $J = 13.0 \text{ Hz}$) y 1.99 (dd, $J = 8.4, 13.5 \text{ Hz}$) se asignaron a los protones adyacentes al grupo carbonilo del C-16; también se observan señales a campo alto δ_{H} 1.46 (1H, m), 1.25 (1H, m) y 0.71 (3H, t, 7.3 Hz) que corresponden a un grupo etilo localizado en C-20 (mediante un experimento HSQC y HMBC); el resto de las señales (Tabla 02 y Fig.15) y sus correspondientes desplazamientos químicos, concuerdan con la estructura propuesta para este compuesto, identificándose como el alcaloide rhazinilam, aislado previamente de *Rhazya stricta*⁷⁰,⁷¹, *Kopsia singaporensis*, y *Aspidosperma quebracho blanco*⁷² y *A. marcgravianum*.³²

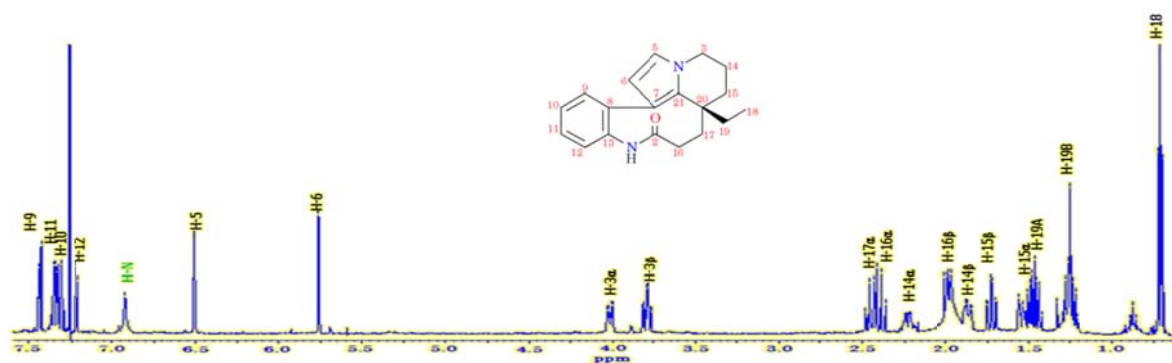


Figura 18. Espectro RMN ^1H de rhazinilam.

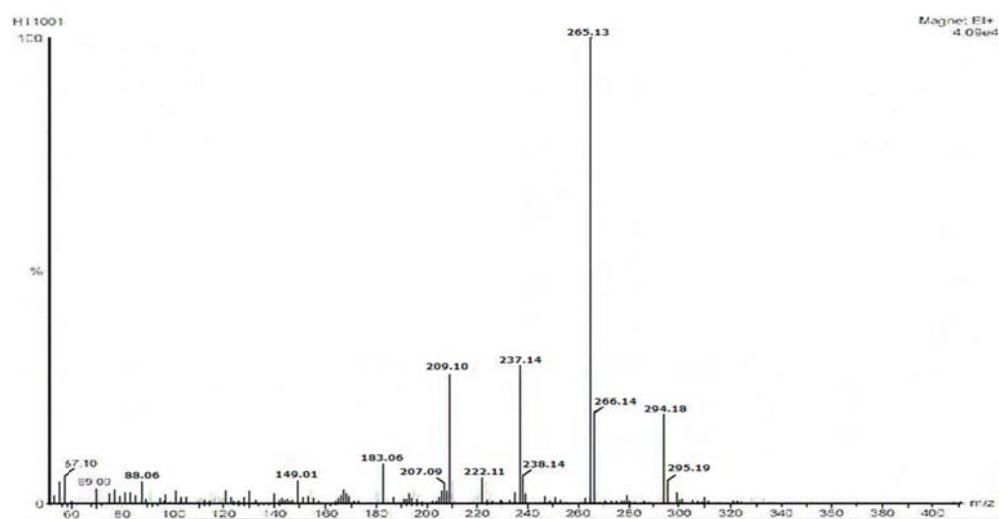


Figura 19. Espectro EM de rhazinilam (7).

Tabla 02. Datos de RMN ^1H , HSQC y HMBC de rhazinilam (7).

| Protón | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ | HSQC ^b | HMBC |
|-------------|------------------------------------|-------------------|-----------------------|
| N-H | 6.91 <i>s</i> | | |
| 2 | | 177.3(s) | |
| 3 α | 4.01 <i>dd</i> (5.2, 11.8) | 46.0(t) | C-5, C-14, C-15, C-21 |
| 3 β | 3.78 <i>dddd</i> (4.7, 12.1, 12.1) | 46.0(t) | C-14 |
| 5 | 6.50 <i>d</i> (2.6) | 119.1(d) | C-3, C-6, C-7, C-21 |
| 6 | 5.75 <i>d</i> (2.5) | 109.5(d) | C-7, C-8, C-21 |
| 7 | | 117.3(s) | |
| 8 | | 140.4(s) | |
| 9 | 7.42 <i>dd</i> (1.8, 7.3) | 131.4(d) | C-7, C-11, C-13 |
| 10 | 7.30 <i>ddd</i> (1.7, 7.4, 7.4) | 127.2(d) | C-8, C-12 |
| 11 | 7.34 <i>ddd</i> (1.7, 7.4, 7.4) | 128.0(d) | C-9, C-13 |
| 12 | 7.20 <i>d</i> (7.5) | 126.8(d) | C-8, C-10 |
| 13 | | 138.0(s) | |
| 14 α | 2.21 <i>m</i> | 19.4(t) | |
| 14 β | 1.85 <i>m</i> | 19.4(t) | |
| 15 α | 1.55 <i>dt</i> (3.2, 13.0) | 33.0(t) | C-19 |
| 15 β | 1.72 <i>ddd</i> (2.9, 13.3, 13.3) | 33.0(t) | C-14, C-17, C-19 |
| 16 α | 2.38 <i>t</i> (13.0) | 28.0(t) | C-2, C-20 |
| 16 β | 1.99 <i>dd</i> (8.4, 13.5) | 28.0(t) | C-2, C-17, C-20 |
| 17 α | 2.45 <i>t</i> (12.8) | 36.6(t) | C-3, C-19, C-20 |
| 17 β | 1.29 <i>m</i> | 36.6(t) | C-3 |
| 18 | 0.71 <i>t</i> (7.3) | 8.2(q) | C-19, C-20 |
| 19A | 1.46 <i>m</i> | 31.9(t) | C-15, C-18, C-20 |
| 19B | 1.25 <i>m</i> | 31.9(t) | C-15, C-18, C-20 |
| 20 | | 38.8(s) | |
| 21 | | 130.6(s) | |

a Entre paréntesis, las constantes de acoplamiento H-H en Hz.

b Las multiplicidades de RMN de ^{13}C fueron establecidas mediante experimento DEPT.

1.3 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN ANTIMALÁRICA

Las especies del género *Aspidosperma* son usadas tradicionalmente en el tratamiento de la malaria y en general los alcaloides indólicos presentan diversa actividad biológica entre ellas: antibacteriana, tripanomicida, leishmanicida antimalárica y anticancerosa.³²

Los criterios de interpretación para los resultados de actividad antimalárica *in vitro*, para considerar si un extracto o compuesto es activo deben presentar un porcentaje de inhibición > 50%. Para que proceda a determinarse los valores de CI_{50} , considerando que valores de $CI_{50} > 10 \mu\text{g/mL}$ y/o mg/mL implican inactividad (0); valores de $CI_{50} \leq 1 \mu\text{g/mL}$ y/o mg/mL , Muy bueno (3); 1,1 - 5 $\mu\text{g/mL}$ y/o mg/mL , Bueno (2); 5,1 - 10 $\mu\text{g/mL}$ y/o mg/mL , Moderado (1).

Fueron evaluados por disponibilidad de la cantidad requerida para las actividades biológicas solo los alcaloides aspidolimina y aspidoscarpina, ambos presentan una similitud estructural y poseen una cadena lateral alílica en el carbono 20 mencionada por algunos autores como importante para presentar actividad antiplasmodial³², sin embargo solo el alcaloide indólico aspidoscarpina presentó una CI_{50} de 7,66 $\mu\text{g/mL}$ (realizado por triplicado) frente a *P. falciparum* cepa FCR-3 cloroquina resistente, que representa una moderada actividad esquizonticida y en el Test del FBIT dio una CI_{50} mayor de 10 mg/mL ; lo que indica que la aspidoscarpina no sigue el mecanismo de acción descrito para el fármaco tradicional cloroquina (4-aminoquinolina); considerando que estructuralmente son diferentes no accionando en una misma diana farmacológica⁷³ por lo que sería un nuevo prototipo para el desarrollo de medicamentos antimaláricos y un buen candidato para estudios preclínicos. Este resultado valida además el uso tradicional antimalárico de la planta en estudio

Otros investigadores (Andrade-Neto et al. 2007) reportan para este mismo alcaloide frente a la cepa multidrogo-resistente *P. falciparum* K1 con una IC_{50} de 0.007 $\mu\text{g/mL}$ (por duplicado) que representa una muy buena actividad.

Para el caso de los alcaloides aislados que presenta un anillo tetrahydrofurano que incluye a los C-18 y C-19, la literatura refiere una actividad antiplasmodial negativa;³² sin embargo algunos autores refieren actividad para el alcaloide aspidolimidina aislado de *A. magalocarpon*.³⁴

CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron dos extractos de la especie *Aspidosperma desmanthum* “Remocaspi”: alcaloidal ácido y alcaloidal básico.
2. La corteza de raíz contiene alcaloides indólicos tipo plumerano: subtipo tabersonina (aspidolimina y aspidoscarpina), subtipo alalakina (14,15 dehidroalalakina), subtipo haplofitina (aspidolimidina) y subtipo quebrachamina (razhinilam), y del tipo aspidospermato subtipo tubotaiwina (19,20-dihidro-11-metoxi-(+)-limatina, 19,20-dihidro-11-metoxi-(+)-limatinina).
3. Por cromatografía en columna y cromatografía capa gruesa preparativa se aislaron 14 alcaloides, por RMN¹H se identificó 7 alcaloides y por el análisis de los espectros de IR, EM, RMN¹H, RMN¹³C, experimentos mono y bidimensionales: HSQC, COSY, HMBC y NOESY, permitió determinar la estructura de los 7 alcaloides que fueron identificados como: aspidolimina, aspidoscarpina, 14, 15- dehidroalalakina, 19,20-dihidro-11-metoxi-(+)-limatina, 19,20-dihidro-11-metoxi-(+)-limatinina, aspidolimidina y rhazinilam.
4. De los 7 alcaloides se identificaron 3 nuevos: 14, 15- dehidroalalakina, 19,20-dihidro-11-metoxi-(+)-limatina y 19,20-dihidro-11-metoxi-(+)-limatinina.
5. Solo la Aspidoscarpina con una CI₅₀ de 7.66 ug/mL presentó actividad antipalúdica *in vitro* frente a *Plasmodium falciparum* cepa referencial FCR-3 cloroquina resistente y negativo al Test de Inhibición de la Ferroprotoporfirina IX (FBIT).

RECOMENDACIONES

1. Realizar la evaluación antimalárica y toxicológica de la aspidoscarpina “*in vivo*” en ratones albinos *Mus musculus*.
2. Evaluar otras posibles actividades biológicas de los alcaloides aislados mediante modelos computarizados de estructura- actividad.
3. Continuar con los estudios preclínicos del alcaloide aspidoscarpina.
4. Continuar con los estudios fitoquímico de otras especies botánicas de uso etnofarmacológico tendiendo a elaborar la farmacopea amazónica y a validar las plantas medicinales.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Perú. Instituto Nacional de Salud. Publicación aprobada con R.J. No 461-2003-J-OPD/INS. Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnostico de la Malaria. Lima: 2003.
2. Breman JG. The Eras of the Hippotamus Manifestation, Determinats, and estimates of the Malaria Burden. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001 (64): 1- 11
3. Sachs Malaney P. The Economics and Social burden of malaria. *Nature.* 2002 (415): 680-685.
4. Chaw I. Dirección General de Salud Estrategia sanitaria nacional de prevención y control de enfermedades metaxenicas y otras trasmitidas por vectores. Disponible en: <http://www.minsa.gob.pe/portal/03-/Boletines/Boletín>
5. Gaitán Ibarra R. Una visión a la terapia antimalárica tradicional y actual desde el descubrimiento hasta su posible desarrollo. *Scientia Et Technica Univ. Tec. de Pereira* (Col) 2007 XIII (033):5-12.
6. Perú, Ministerio de Salud: Sistema de Vigilancia de la Resistencia a los Medicamentos en el Perú, Lima; 2001.
7. Bueno C, Cabezas C, Chang J, Mendoza, Durand S, Seminario L. *et. al.* The Economic Impact of Malaria in Peru, (Lima) Minsa; 1999. Perú, Selección de una metodología de Evaluación Económica de las principales intervenciones de Prevención y Control de la malaria, utilizadas por el Ministerio de Salud Lima: MINSA.
8. Hoffman SL, Subramanian GM, Collins W, Frank H, Venter JC. *Plasmodium Human and Modern Health Care.* (Geneva), 1991: 14-25.
10. Vásquez Martínez R. Flórula de las Reservas Biológica de Iquitos, Perú Allpahuayo – Mishana Ed. Missouri Botanical Garden. IN USA. 1997.
11. Instituto de Investigación de la Amazonia Peruana. Proyecto: Plantas Medicinales y Biocidas de la Amazonia Peruana, Informe Técnico IIAP. 2000. Perú

12. Maco M. y Ruiz L. Tesis: Evaluación Antimalárica in Vitro y Tamizaje Fitoquímico de 26 especies vegetales de la cuenca del río Nanay 2006 Iquitos –Perú 2007
13. Roberts MF, Wink M. Chemical taxonomy of alkaloids. Introduction in Alkaloids: Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications. Plenum Press (New York)1998; 1-787-107.
14. Marcano D, Hasegawa M. Fitoquímica Orgánica. Ed. Cons. De Desarrollo Científico y Humanístico Univ. Central de Venezuela (Caracas)1991: 281- 393.
15. Bruneton J. Farmacognosia, Fitoterapia Plantas Medicinales. 2da ed. Editorial Acribia (Zaragoza) 2001:775-1074.
16. Kuklinski C. Farmacognosía Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural. Ed. Omega (Barcelona) 2000:167-182.
17. Lock O. Investigación fitoquímica. Método en el estudio de productos naturales. *Pontificia Univ. Católica del Perú*. (Lima)1994
18. Loyola VM, Sánchez P, Canto B, Gutierrez LC, Galaz RM, Moreno O. Biosíntesis de los Alcaloides Indólicos. Una Revisión Crítica. *Rev. Soc. Quím. México* 2004 (48) 67-94.
19. Cordell GA, Quinn-Beattie ML, Farnsworth NR. *Review Article* The potencial of Alkaloids in Drug Discovery *Phytoterapy Research* 2001 15: 183-205.
20. Kisakürec MV, Hesse M. Indole and Biogeneticaly Related Alkaloids. Ed. JD. Phillipson. Academic Press (London) 1982:11.
21. Wlliand Pelletier S. Alkaloids 1983: 211-376.
22. Cordell G A. Introduction to Alkaloids. Ed. John Wiley & Sons, 1981.
23. Pereira M de M, Jácome RL, Alcantara A F, Alves R, Raslan DS. Alcalóides Indólicos de Espécies Do Género *Aspidosperma* (APOCINACEAE). *Quim. Nova*. 2007; 30 (4): 970-983.

24. Rengifo E. Plantas Amazónicas Utilizadas para el Tratamiento de la Malaria IIAP (Iquitos) 1999.
25. Duke JA, Vasquez MR. Amazonian Ethnobotanical Dictionary, CRC Press Inc. Boca raton, Florida, USA, 1994: 215.
26. Morales JF. Apocynaceae In: Hammel, B.E., Zamora, N. Y Grayum, M.H. (Eds.). Manual de Plantas de Costa Rica. Missouri Bot. Gard. Press, St. Louis & Inst. Nac. De Biodiversidad, Sto. Domingo de Heredia - Costa Rica.
27. Nunes DS, Koike L, Taveira JJ, Reis FAM. Phytochemistry 1992 ; 31: 2507
28. Zirihi GN, Mambu L, Guede-Guina F, Bodob B, Grellier P. In vitro Antiplasmodial Activity and Citotoxicity of 33 West African Plants Used for Treterment of Malaria. Ethnopharmacology. 2005; 98: 281-285.
29. Verpoorte, R.; Ruigrok CLM. Svendsen A.B. Medical Plants of Surinam. Planta Med. 1982; 46:149.
30. Verpoorte R, Kos-Kuych E, Tsoi ATA, Ruigrok CLM, Jong G, Svendsen A B. Medicinal Plants of Surinam, III : Antimicrobially Active Alkaloids from *A. excelsum*, Planta Med. 1983; 48: 283-289.
31. Kvist LP, Christensen SB, Rasmussen HB, Mejia K, Gonzales A. Identificación and Evaluation of Peruvian Plants Used to Treat Malaria and Leishmaniasis. Ethno-Pharmacology 2006; 106: 390-402.
32. Mitaine AC, Sauvain M, Valentin A, Callapa J, Mallié M, Zeches M. Antiplasmodial Activity of *Aspidosperma* indole alkaloids, Phytomedicine 2002; 9:142-145.
33. Andrade VF, Pohlit A M, Pinto ACS, Silva ECC, Nogueira KL, Melo MR. *et al*, In vitro Inhibition of *P. falciparum* by Substances Isolated from Amazonian Antimalarial Plants. Mem Inst. Oswaldo Cruz, (Río de Janeiro) 2007; 102 (3): 359-365.
34. Mitaine AC, Weniger B, Sauvain M, Lucumi E, Aragón R, Zeches-Hanrot MZ. Indole Alkaloids from the Trunk Bark of *Aspidosperma megalocarpon* Planta med. 1998; 64: 487.

35. Araújo JrJ X, Antheaume C, Trindade RC P, Schmitt M, Bourguignon JJ, Goulart Sant AE Isolation and Characterisation of the Monoterpenoid Indole Alkaloids of *A. pyrifolium* Phytochem Rev. 2007; 6:183-188.
36. Craveiro AA, Matos FJA, Segur LM, Alkaloids of *Aspidosperma pyrifolium* Phytochemistry 1983; 22: 1526-1528.
37. Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 10^{ma} ed., México: Ed. Mc Graw Hill Interamericana; 2004 Vol II
38. Katzung BG. Farmacología Básica y Clínica 9^{na} ed. Editorial Manual Moderno 2005.
39. Flores J. Farmacología 3^{ra}Ed. Barcelona: Editorial MASSON; 2000.
40. Deharo, E.; Muñoz, V.; Gautret, P. y Sauvain, M. “Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas” Bolivia, 2002, pp: 31-93.
41. White N. Antimalarial Drug Resistance. The Journal of Clinical Investigation 2004; 113 (8):1084-1092.
42. Gonzales D, Nuevas Dianas Terapéuticas Para el Tratamiento de la Malaria. Enf. Emerg. Granada 2005; 7 (1): 40-43.
43. Trager W. Jensen JB. Human Malaria Parasites in Continuous Culture. Nature 263, 5580: 767-769.
44. Waki S, Miyagami T, Nakazawa S, Igarrashi I, Suzuki M. Maintenance and Propagation of Human Malaria Parasites in Culture Using an Ordinary CO₂ Incubator. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1984; 78 (3): 418.
45. Christofinis GJ, Millar HA. Simplified Method for Cryopreservation of *P. falciparum* from Continuous *in vitro* Cultures. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 1983; 77 (2): 123-126.
46. Bravo JA, Sauvain M, Gimenez A, Muñoz V, Callapa J, Le Men-Olivier L, Massiot G, Lavaud C. Bioactive Phenolics from *Amburana crearensis*. Phytochemistry 1999; 50: 71-74.

47. Le Bras J, Deleron P. In Vitro Study of Drug Sensitivity of *P. falciparum* Evaluation of New Semi-microtest American. Tropical Medicine and Hygiene 1983; 32: 447-451.
48. Goldberg D, Slater A, Cerami A, Hendersom G. Hemoglobin Degradation in the Malaria Parasite *P. falciparum* an Ordered Process in a Unique Organelle. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 1990; 87: 931-935.
49. Goldberg D, Slater A, Cerami A, Hendersom G. The Pathway of Haemoglobin Degradation in Malaria. Parasitology Today 1992; 8: 280-283.
50. Egan TJ, Marques HM. The Role of the Haem in the Activity of Chloroquine and Related Antimalarial Drugs. Coordination Chemistry Reviews 1999; 192: 493-517.
51. Egan TJ, Ross DC, Adams PA. Quinoline Antimalarial Drugs Inhibits Spontaneous Formation of B-Haematin (malaria pigment) FEBS Letters 1994; 352: 54-57.
52. Dorn A, Vipagunta SR, Matile H. An assessment of Drug Haematin-binding as a Mechanism for Inhibition of Haematin Polymerization by Quinoline Antimalarials, Biochemical Pharmacology 1998; 55: 727-736.
53. Raynes K, Foley M, Tilley L, Deady L. Novel Bisquinoline Antimalarials. Biochemical Pharmacology 1996; 52: 551-559.
54. Savaskan S, Kompis I, Hesse M, Schmid H. Helvetica Chimica Acta 1972; 55, 2861.
55. Keith S, Brown Jr, Dejerassi C. Alkaloids Studies XLVI.¹ The Alkaloids of *Aspidosperma obscurinervium* Azembuja. A New Class of Heptacyclic Indole Alkaloids. Tetrahedron 1964: 2451-2463.
56. Pinar M, Philipsborn V, Vetter W, Schmid H. Helvetica Chim. Acta 1962; 40: 2260.
57. Ruben F. Garcia M. Keith S. Brown Jr. Alkaloids of Three *Aspidosperma* Species. Phytochemistry 1976; 15: 1093-1095.
58. Laguna A, Dolejs L, Novotny L. Alkaloids from *Strempeliopsis strempeloides* K.Schum Collection Czechoslov. Chem. Commun., 1980; 45: 1419.

59. Gilbert B, Brissolèse JA, Wilson JM, Budzikiewicz H, Lois J, Durham, Djerassi C. Chemistry and Industry 1962;1949.
60. Robert GMT, Ahond A, Poupat C, Potier P, *Aspidosperma* de Guyane: Alcaloides de *Aspidosperma marcgravianum* Journal of Natural Products 1983; 46 (5): 694-707.
61. Djerassi C, Archer AAP, George T. Gilbert B, Antonaccio LD. Alkaloid Studies-XXX¹ Isolation and Constitution of Three New *Aspidosperma* Alkaloids: Cylindrocarpine, Cylindrocarpidine and Pyrifolidine Tetrahedron 1961; 16: 212 – 223.
62. Mitaine AC, Weniger B. Sauvain M, Lucumi F, Argon R, Zeches- Hanrot M. Indole Alkaloids from the Trunk of *Aspidosperma megalocarpon*. Planta médica 1998; 64: 487
63. Thomas DW, Schnoes JK, Biemann K, Experientia 1969; 25: 678.
64. Robert GMT, Ahond A. Poupat C, Potier P. *Aspidosperma* de Guyane: Alcaloides Des Graines de *Aspidosperma oblongum*. Natural Products 1983; 46(5): 708-722.
65. Gilbert B, Duarte AP, Nakagawa Y, Joule JA, Flores S E. Alkaloid Studies-L1 The Alkaloids of Twelve *Aspidosperma* Species 1965; 21: 1141 - 1166.
66. Keith S. Brown, Jr., Wolfango E. Sánchez L., Antonio de A. Figueiredo, and Joaquim M. Ferreira Filho. *J. Am. Chem. Soc.* 1966; 88 (21): 4984.
67. Miguel Urrea, Alain Ahond, Henri Jacquemin, Siew-Kwong Kan, Christiane Poupat, Pierre Potier, et Maurice-Marie Janot. *C. R. Acad. Sci., Paris* 1978; 287 (3): 63.
68. Pinar M, Schmid H. *Helvetica Chimica Acta*, 1967; 50 (12): 89
69. Mitaine AC, Mesbah K, Richard B, Petermann C, Arrazola S, Moretti C, Hanrot MZ, Oliver LLM. Alkaloids from *Aspidosperma* Species from Bolivia. *Planta Med.* 1996; 62: 458- 461
70. Morita H, Awang K, Hamid A, Koichi Takeya H, Itokawa H, Kobayashi J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2005; 15: 1045.
71. Banerji A, Majunder P L, Chatterjee A. *Phytochemistry* 1970; 9: 1491.

72. Schnoes H.K, Burlingame AL, Biemann K. Application of Mass Spectrometry to Structure Problems:¹ The Occurrence of Eburnamenine and Related Alkaloids in *Rhazya stricta* and *Aspidosperma Quebracho blanco*. Tetrahedron letters 1962; 3 (22): 993-999.
73. Andrade-Neto V, Pohlit A, Pinto AC In vitro Inhibition of *Plasmodium falciparum* by Substances Isolated from Amazonian antimalarial. Mem Inst. Oswaldo Cruz 2007; 102 (3): 359-365.
74. Basilico N, Monti D, Oliaro, Taramelli D. A Microtitre-based Method for Measuring the Haem Polymerization Inhibitory Activity (HPIA) of Malaria Drugs. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 1998; 42:55-60.

| | |
|--|----|
| 3.5.3 14, 15- Dehidroalalakina (3) | 40 |
| 3.5.4 19,20-Dihidro-11-metoxi-(+)-limatina (4) | 41 |
| 3.5.5 19,20-Dihidro-11-metoxi-(+)-limatinina (5) | 41 |
| 3.5.6 Aspidolimidina (6) | 42 |
| 3.5.7 Rhazinilam (7) | 43 |

CAPÍTULO III

| | |
|--|----|
| 1 DISCUSIONES Y RESULTADOS | 47 |
| 1.1 Resultados | 47 |
| 1.2 Determinación Estructural de los Alcaloides Aislados | 47 |
| 1.2.1 Aspidolimina (1) | 47 |
| 1.2.2 Aspidocarpina (2) | 49 |
| 1.2.3 14, 15- dehidroalalakina (3) | 51 |
| 1.2.4 19,20-dihidro-11-metoxi-(+)-limatina (4) y 19,20-dihidro-11-metoxi-(+)-limatinina (5) | 55 |
| 1.2.5 Aspidolimidina (6) | 56 |
| 1.2.6 Rhazinilam (7) | 58 |
| 1.3 Resultados de la Evaluación Antimalárica | 61 |

| | |
|---------------------|----|
| CONCLUSIONES | 62 |
|---------------------|----|

| | |
|------------------------|----|
| RECOMENDACIONES | 63 |
|------------------------|----|

| | |
|-----------------------------------|----|
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 64 |
|-----------------------------------|----|

| | |
|---------------|----|
| ANEXOS | 71 |
|---------------|----|

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 01 Datos de RMN ¹ H, HSQC y HMBC de 14,15-dehidroalalakina (4) | 54 |
| Tabla 02 Datos de RMN de ¹ H, HSQC y HMBC de rhazinilam (7) | 60 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 01 Origen biosintético de los diferentes alcaloides | 07 |
| Figura 02 Tipos de esqueletos de alcaloides indólicos | 08 |
| Figura 03 Subtipos de alcaloides indólico | 09 |
| Figura 04 Subtipos de alcaloides indólicos | 10 |
| Figura 05 Subtipos de alcaloides indólicos | 11 |

| | |
|---|----|
| Figura 06 Subtipo de alcaloides indólicos | 12 |
| Figura 07 Subtipos de alcaloides indólicos | 13 |
| Figura 08 Subtipo de alcaloides indólicos | 14 |
| Figura 09 Subtipo de alcaloides indólicos | |
| Figura 10 Extracción de alcaloides de la Corteza de Raíz de <i>A. desmanthum</i> | 31 |
| Figura11 Diagrama de fraccionamiento, aislamiento y purificación de la corteza de raíz de <i>A. desmanthum</i> del extracto alcaloidal ácido | 45 |
| Figura12 Diagrama de fraccionamiento, aislamiento y purificación de la corteza de raíz de <i>A. desmanthum</i> del extracto alcaloidal básico | 46 |
| Figura 13 NOESY de aspidolimina. | 48 |
| Figura 14 Espectros de RMN de ^1H de aspidocarpina (2) y aspidolimina (1) | 49 |
| Figura 15 Fraccionamiento de masas de aspidocarpina | 50 |
| Figura 16 NOESY de 14,15- dehidroalalakina (3) | 53 |
| Figura 17 Espectros de RMN ^1H de haplocidina (A) y aspidolimidina (B) | 57 |
| Figura 18 Espectro de RMN de ^1H de rhazinilam | 59 |
| Figura 19 Espectro de EM de rhazinilam (7) | 59 |
| Figura 20 Espectro de RMN de ^{13}C de aspidolimina (1) | 72 |
| Figura 21 Espectro de Masas aspidolimina (1) | 72 |
| Figura 22 Espectro de HMBC de aspidolimina (1) | 73 |
| Figura 23 Espectro de COSY de aspidolimina (1) | 73 |
| Figura 24 Espectro de NOESY de aspidolimina (1) | 74 |
| Figura 25 Espectro de IR de aspidolimina (1) | 74 |
| Figura 26 Espectro de UV de aspidolimina (1) | 75 |
| Figura 27 Espectro de RMN de ^{13}C de aspidocarpina (2) | 76 |
| Figura 28 Espectro de IR de aspidocarpina (2) | 76 |
| Figura 29 Espectro de Masas de aspidocarpina (2) | 76 |
| Figura 30 Espectro de HSQC de aspidocarpina (2) | 77 |
| Figura 31 Espectro de HMBC de Aspidocarpina (2) | 77 |
| Figura 32 Espectro de COSY de Aspidocarpina (2) | 78 |
| Figura 33 Espectro de NOESY de Aspidocarpina (2) | 78 |
| Figura 34 Espectro de UV de Aspidocarpina (2) | 79 |
| Figura 35 Espectro de RMN de ^1H de 14,15-Dehidroalalakina (3) | 80 |

| | |
|--|-----|
| Figura 36 Espectro de RMN de ^{13}C de 14, 15-Dehidroalalakina (3) | 80 |
| Figura 37 Espectro de HSQC de 14,15-Dehidroalalakina (3) | 81 |
| Figura 38 Espectro de HMBC de 14, 15-Dehidroalalakina (3) | 81 |
| Figura 39 Espectro de COSY de 14, 15-Dehidroalalakina (3) | 82 |
| Figura 40 Espectro de Masas de 14,15-Dehidroalalakina (3) | 82 |
| Figura 41 Espectro de IR de 14,15- Dehidroalalakina (3) | 83 |
| Figura 42 Espectro de UV de 14,15- Dehidroalalakina (3) | 83 |
| Figura 43 Espectro de ^1H de 19, 20- Dihidro, 11- metoxi- (+)-limatina (4) | 84 |
| Figura 44 Espectro de ^{13}C de 19, 20- Dihidro, 11- metoxi- (+)-limatina (4) | 84 |
| Figura 45 Espectro de HSQC de 19, 20- Dihidro, 11- metoxi- (+)-limatina (4) | 85 |
| Figura 46 Espectro de HMBC de 19, 20- Dihidro, 11- metoxi- (+)-limatina (4) | 85 |
| Figura 47 Espectro de COSY de 19, 20- Dihidro, 11- metoxi- (+)-limatina (4) | 86 |
| Figura 48 Espectro de NOESY de 19, 20- Dihidro, 11- metoxi- (+)-limatina (4) | 86 |
| Figura 49 Espectro de EM de 19, 20- Dihidro, 11- metoxi- (+)-limatina (4) | 87 |
| Figura 50 Espectro de RMN de ^1H de 19,20- Dihidro, 11- Metoxilimatinina (5) | 88 |
| Figura 51 Espectro de RMN de ^{13}C de 19,20- Dihidro, 11- Metoxilimatinina (5) | 88 |
| Figura 52 Espectro de Masas de 19,20- Dihidro, 11- Metoxilimatinina (5) | 89 |
| Figura 53 Espectro de IR de 19,20- Dihidro, 11- Metoxilimatinina (5) | 89 |
| Figura 54 Espectro UV de 19,20- Dihidro, 11- Metoxilimatinina (5) | 90 |
| Figura 55 Espectro de RMN de ^1H de Aspidolimidina (6) | 91 |
| Figura 56 Espectro de RMN de ^{13}C de Aspidolimina (6) | 91 |
| Figura 57 Espectro de UV de Aspidolimina (6) | 92 |
| Figura 58 Espectro de RMN de ^1H de Rhazinilam (7) | 93 |
| Figura 59 Espectro de RMN de ^{13}C de Rhazinilam (7) | 93 |
| Figura 60 Espectro de HSQC de Rhazinilam (7) | 94 |
| Figura 61 Espectro de HMBC de Rhazinilam (7) | 94 |
| Figura 62 Espectro de COSY de Rhazinilam (7). | 95 |
| Figura 63 Evaluación Antiplasmodial contra <i>Plasmodium falciparum</i> | 98 |
| Figura 64 Test del FBIT | 99 |
| Figura 65 Obtención de Extractos | 100 |
| Figura 66 Aislamiento y purificación de Alcaloides | 101 |

PRUEBAS ANTIMALARICAS

Evaluación de la Actividad Antimalárica *in vitro* de Extractos y Fracciones

(MMDH11.00)

96

Test de Inhibición de la Biomineralización de la Ferriprotoporfirina IX (FBIT)

97

ANEXOS

ESPECTROS

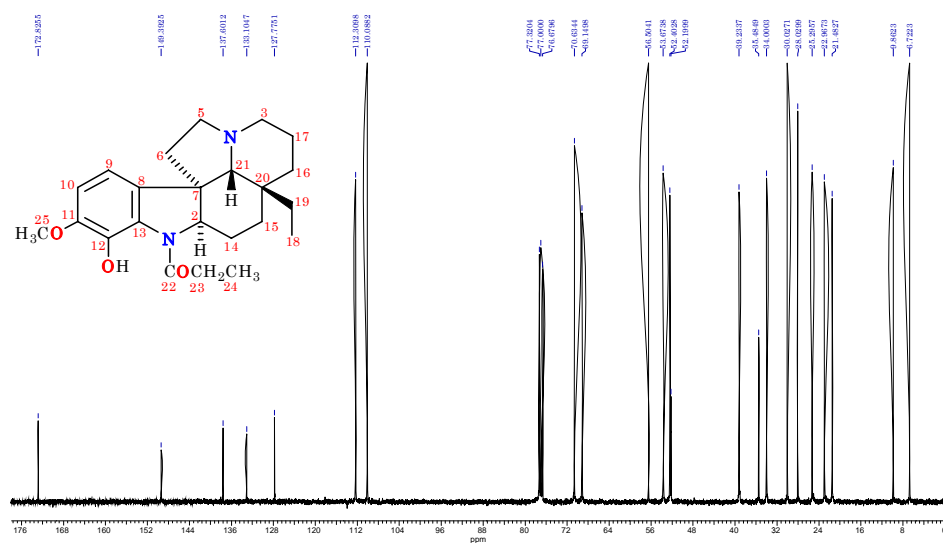
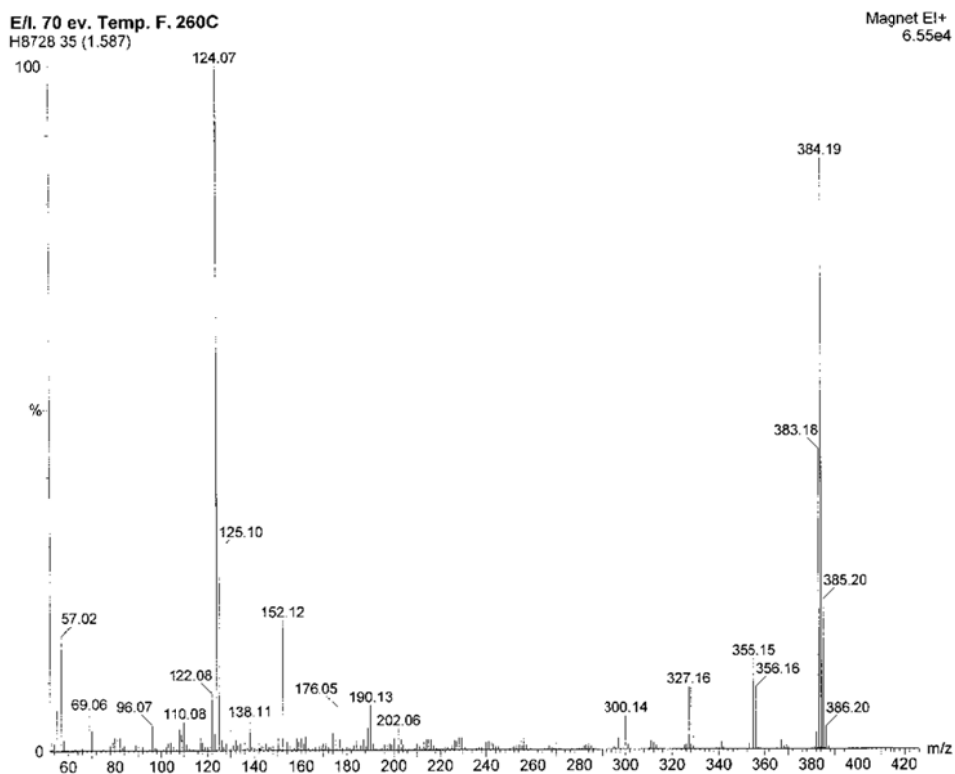
Figura 20. Espectro RMN ^{13}C de aspidolimina (1)

Figura 21. Espectro de Masas aspidolimina (1)

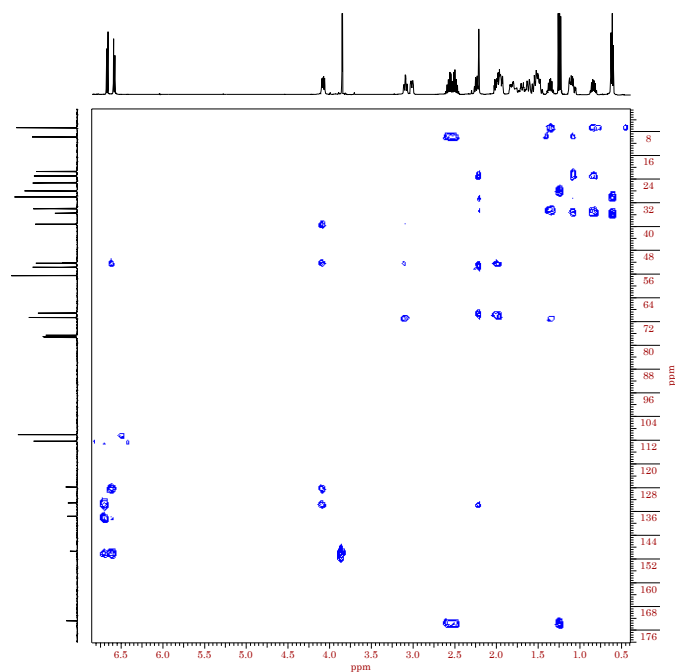


Figura 22. Espectro HMBC de aspidolimina (1)

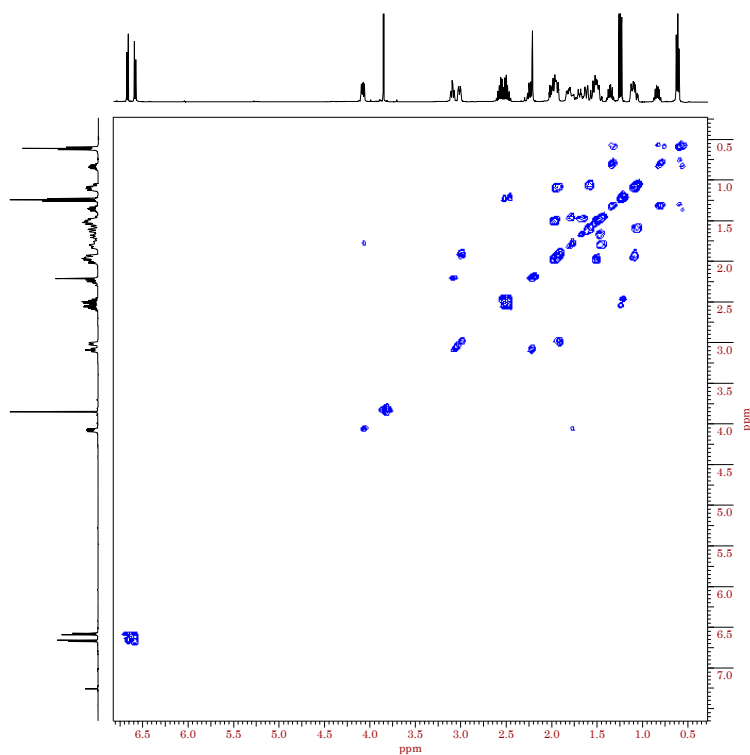


Figura 23. Espectro COSY de aspidolimina (1)

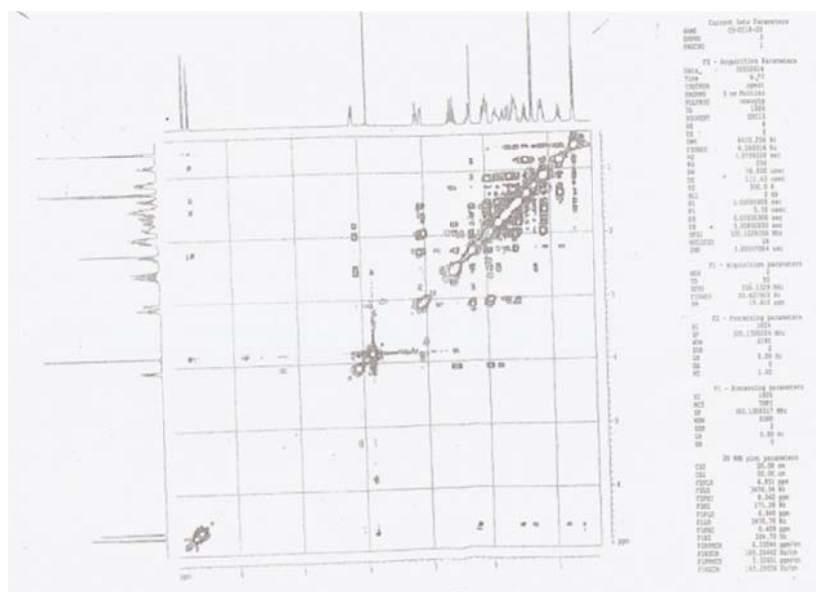


Figura 24. Espectro NOESY de aspidolimina (1)

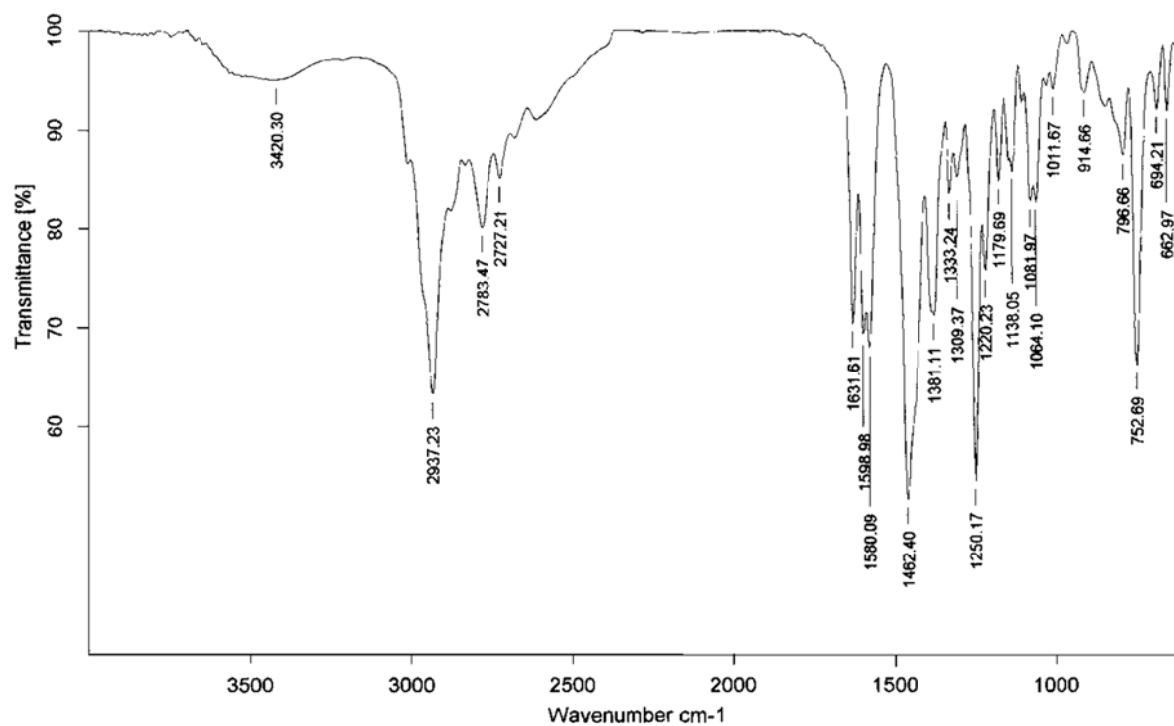


Figura 25. Espectro IR de aspidolimina (1)

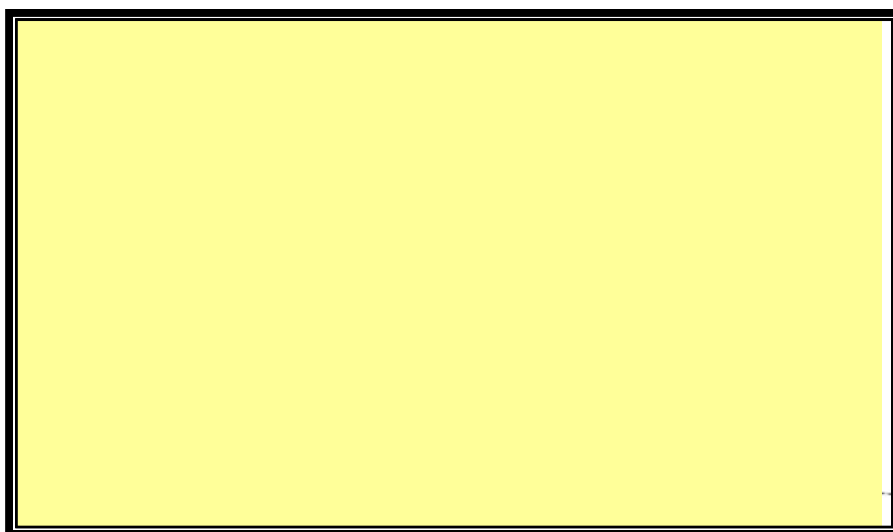


Figura 26. Espectro UV de aspidolimina (1)

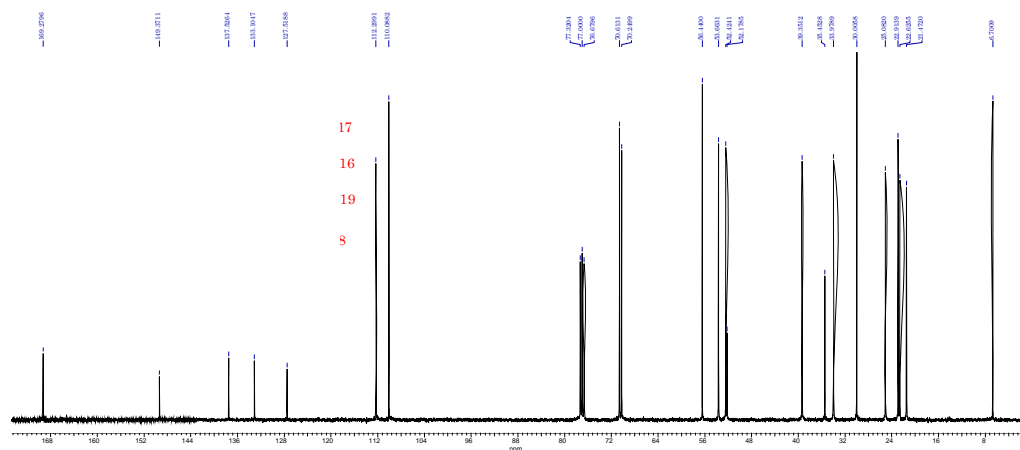


Figura 27. Espectro RMN ^{13}C de aspidoscarpina (2)

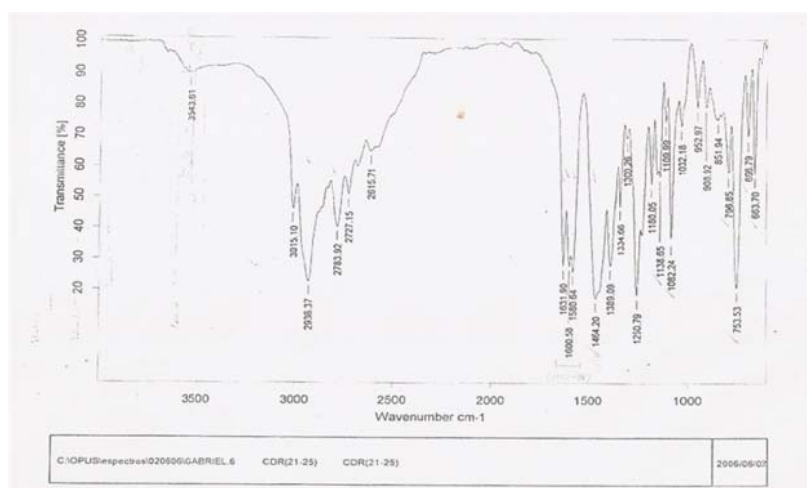


Figura 28. Espectro IR de aspidoscarpina (2)

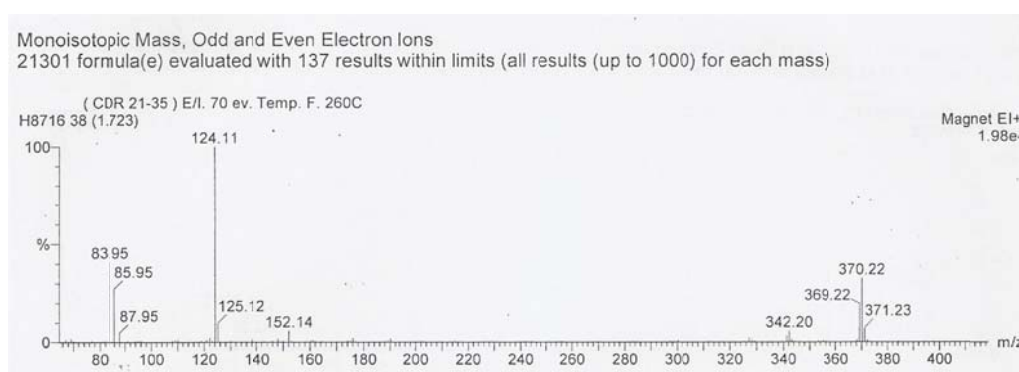


Figura 29. Espectro de Masas de aspidoscarpina (2)

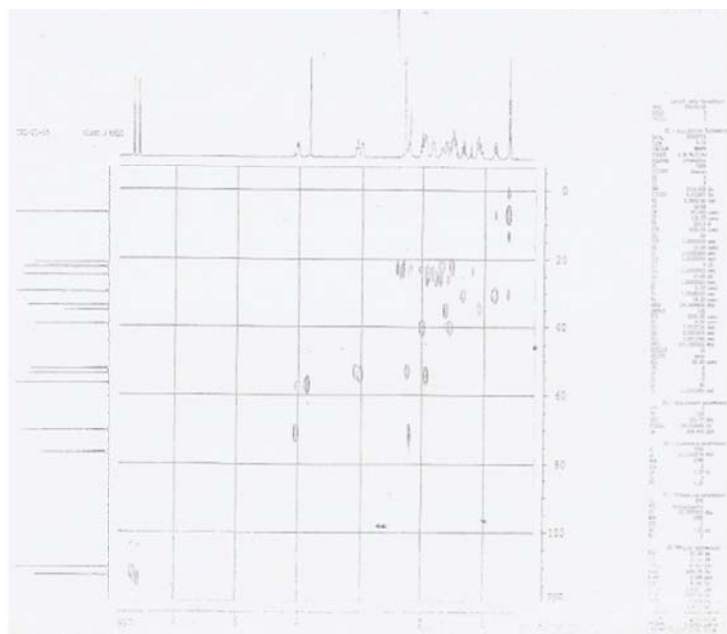


Figura 30. Espectro HSQC de aspidocarpina (2)

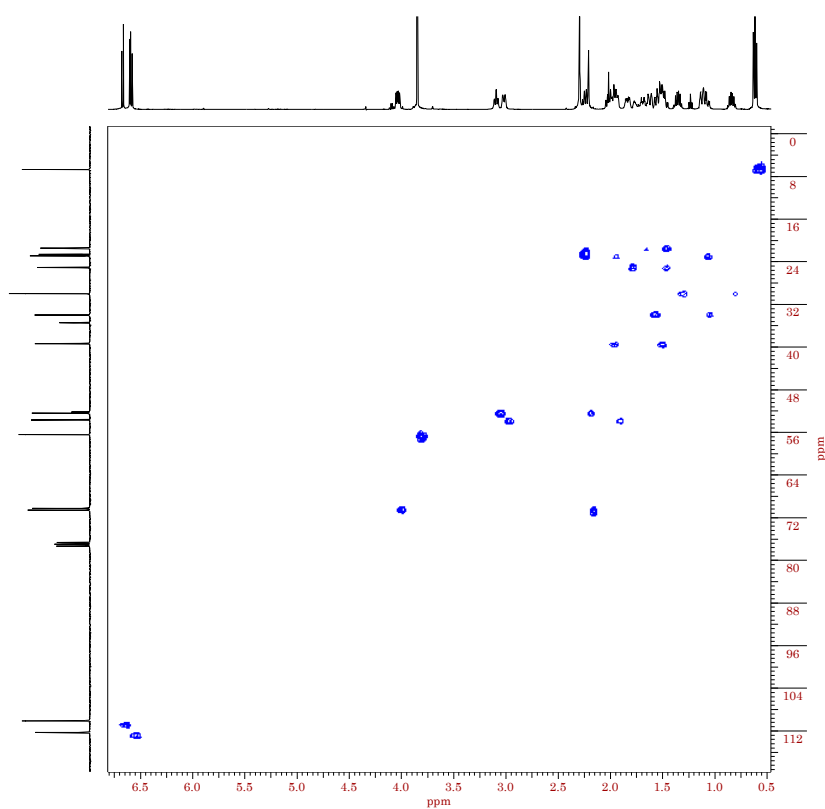


Figura 31. Espectro HMBC de aspidocarpina (2)

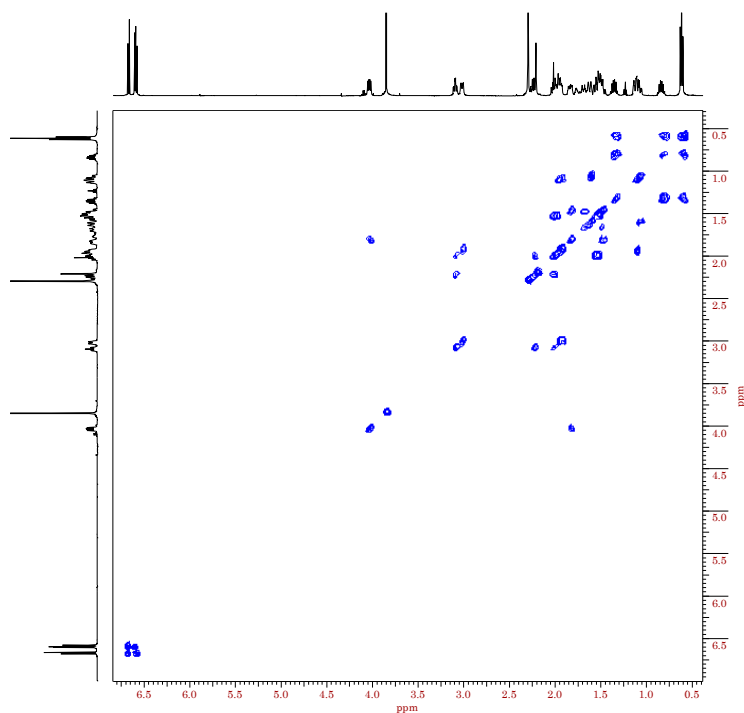


Figura 32. Espectro COSY de aspidocarpina (2)

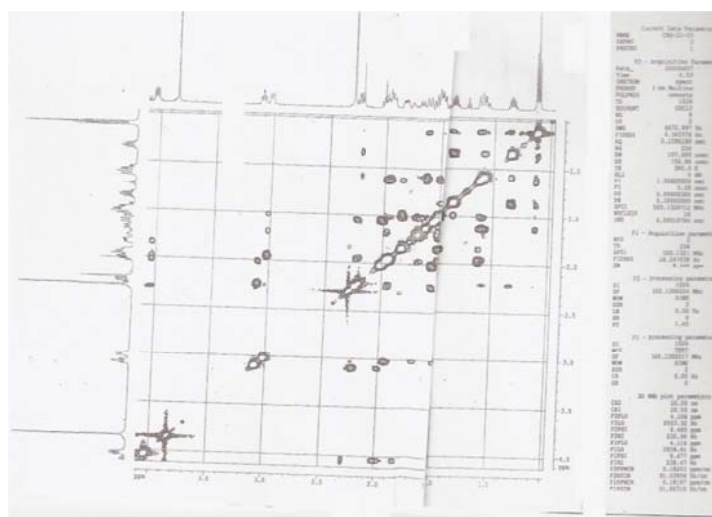


Figura 33. Espectro NOESY de aspidocarpina (2)

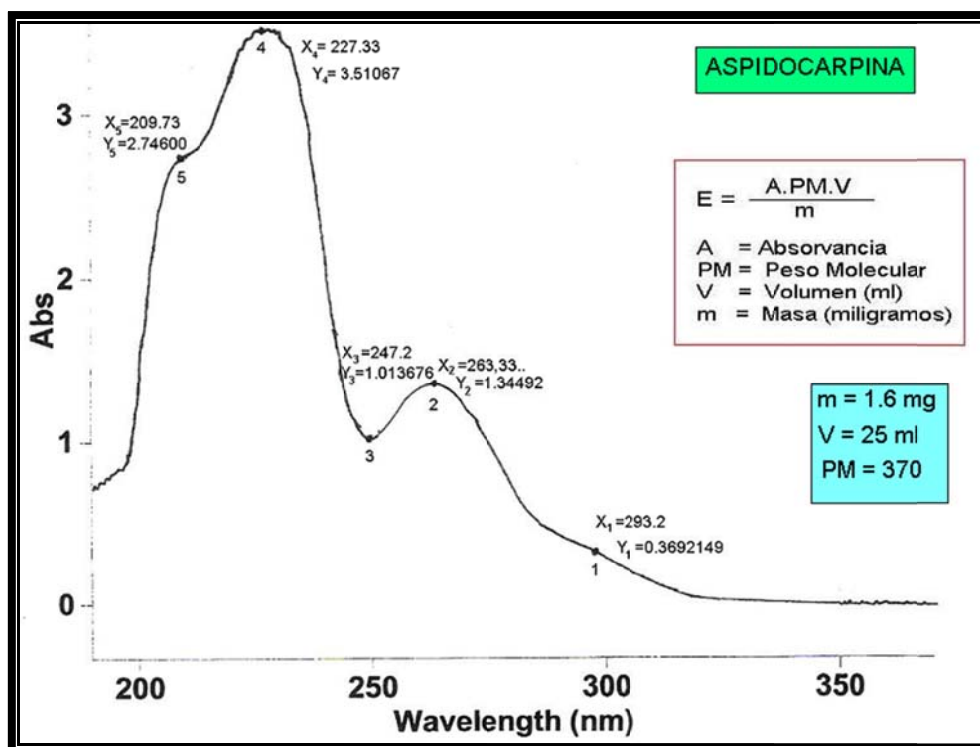


Figura 34. Espectro UV de aspidocarpina (2)

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VITRO DE EXTRACTOS Y FRACCIONES (MMDH11.00)

Se utilizó la cepa de *Plasmodium falciparum* FCR-3 cloroquina resistente la cual fue descongelada y cultivada de acuerdo al método descrito por TRAGER Y JENSEN (1976) con ciertas modificaciones. Brevemente el cultivo consistió en lo siguiente: En un frasco de cultivo de 25cm² que contenía 9,5mL de medio RPMI 1640 DIFCO suplementado con 10% de plasma humano inactivado (pool de plasma de donantes del grupo O⁺ tratados a 56°C por 1 hora), 25mM de NaHCO₃, 50ug/mL de hipoxantina y 20ug/mL de gentamicina, se añadió 500uL de los eritrocitos lavados sanos (hematocrito del cultivo de 5%). Posteriormente se gasificó por 2 minutos con la mezcla de gases (5% O₂, 5% CO₂ y 90% de N₂). Cuando el cultivo de la cepa alcanzó una parasitemia igual o superior a 3%, se sincronizó con sorbitol al 5%. Para la evaluación *in vitro* de la actividad antimalárica se utilizó el método visual descrito en DEHARO, et. al (2002)⁴⁰. Para la cual se pesó 2mg de la muestra y se disolvió en 1ml de dimetilsulfóxido (DMSO), obteniendo una concentración de 2mg/mL, una vez disuelto se procedió a realizar las diluciones en medio de cultivo RPMI (5, 2.5, 1.25 µg/mL), se colocó en la microplaca de 96 pozos, luego se añadió el cultivo de parásitos (hematocrito 2%, parasitemia 1%), se empleo como control positivo Cloroquina difosfato (Sigma) a las concentraciones de 1; 0,5; 0,25µM, etc y como control negativo DMSO (0,5; 0,25%), se colocó en el caldle Jarr, se gasificó (5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂) y se incubó por 48 horas. Transcurrido el tiempo se realizó los frotices y se colorearon con tinción giemsa, se hizo la lectura de las láminas. El ensayo se realizó por triplicado. El análisis de los resultados se realizó con la ayuda del programa EXCEL.

Calculo del porcentaje de Inhibición de la parasitemia

TEST DE INHIBICIÓN DE LA BIOMINERALIZACIÓN DE LA FERRIPROTOPORFIRINA IX (FBIT)

Para la evaluación “in vitro” mediante FBIT, se empleó el método descrito por (BASILICO, N. et. al. 1998), (SULLIVAN. et. al. 1996)⁷⁴. En una microplaca de 96 pozos se colocó 50µL de solución de clorhidrato de hemina, 100µL de buffer acetato de sodio y 50µl de la muestra a concentración de 10mg/ml para determinar el % de inhibición (5mg/mL, 2.5mg/mL y 1.25mg/mL para determinar la CI_{50}) se utilizó como control positivo Cloroquina difosfato (Sigma) y como control negativo DMSO. La placa se incubó a 37°C por 18 a 24 horas, se centrifugó a 3000rpm por 5 minutos, para eliminar el sobrenadante, posteriormente se lavó cada pocillo por una vez con 200 µ de DMSO y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió con 150 µl de NaOH 0.1N, la lectura de absorbancia se realizó a 450 nm utilizando un lector de ELISA. El análisis de los resultados se realizó en el programa EXCEL.

Calculo del porcentaje de Inhibición de la polimerización del heme

$$\% \text{ Inhibición} = 100 \times 1 - (\text{DO extracto})/\text{DO control}$$

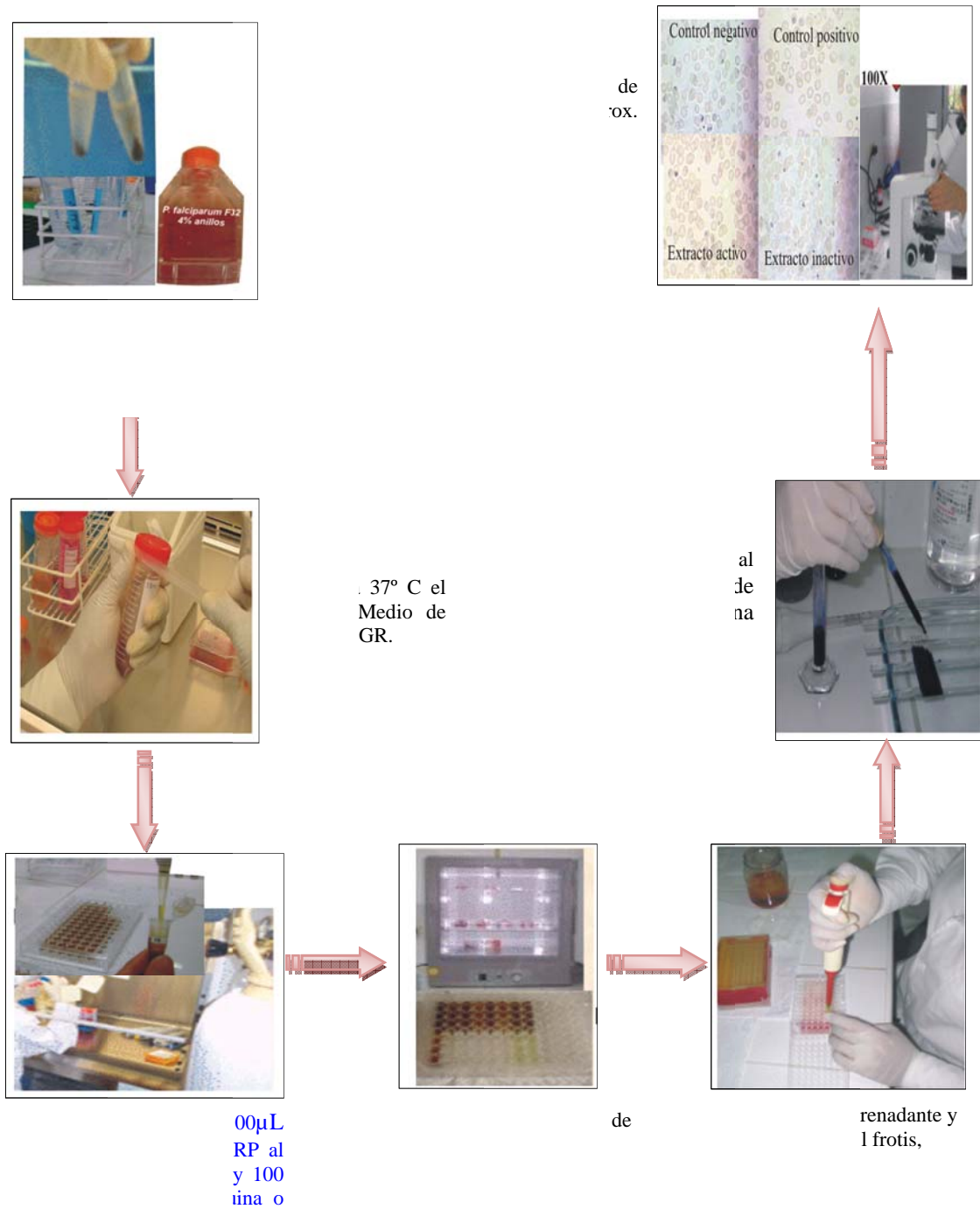


Figura 63. Evaluación Antiplasmodial contra *Plasmodium falciparum*

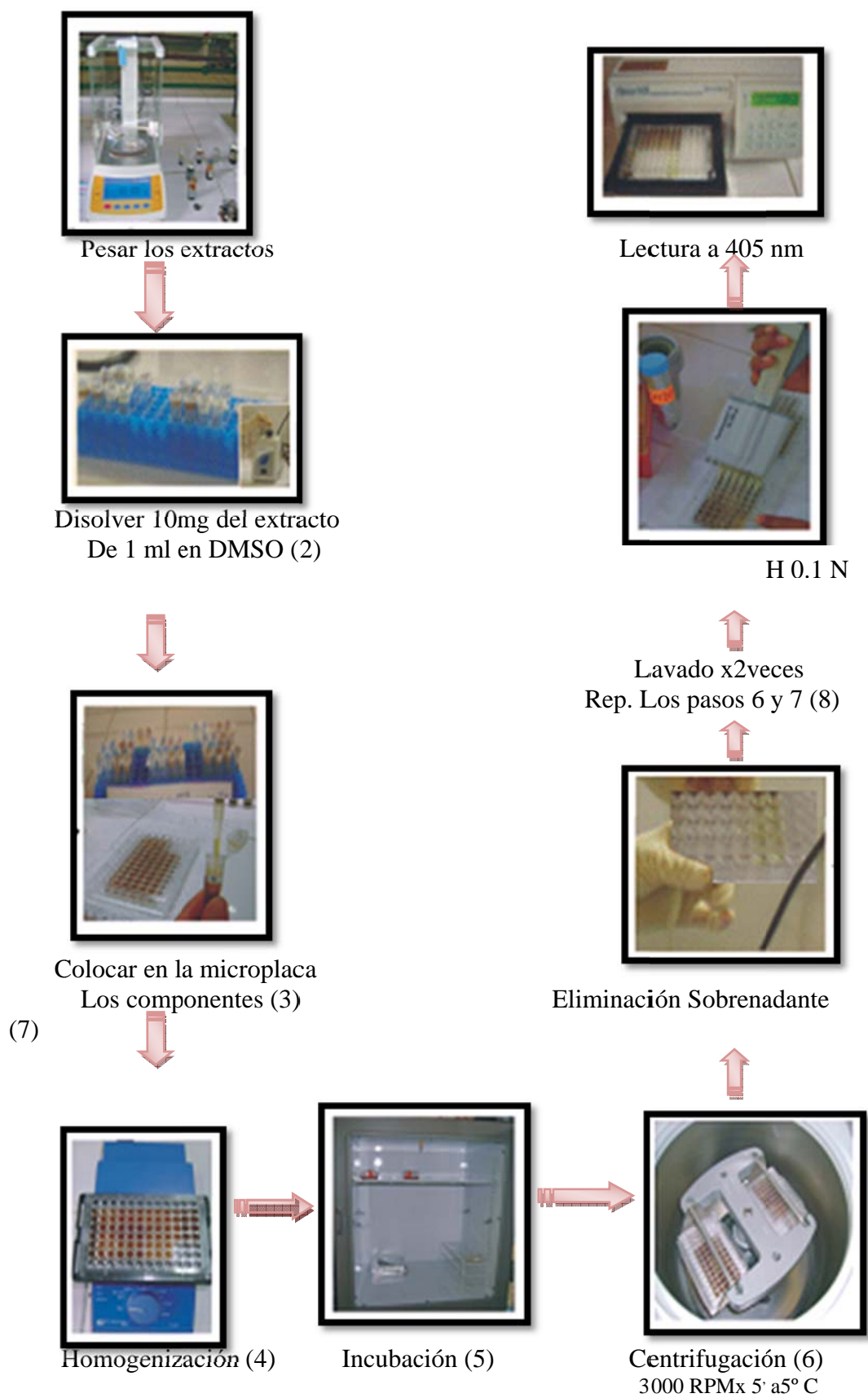


Figura 64. Test del FBIT

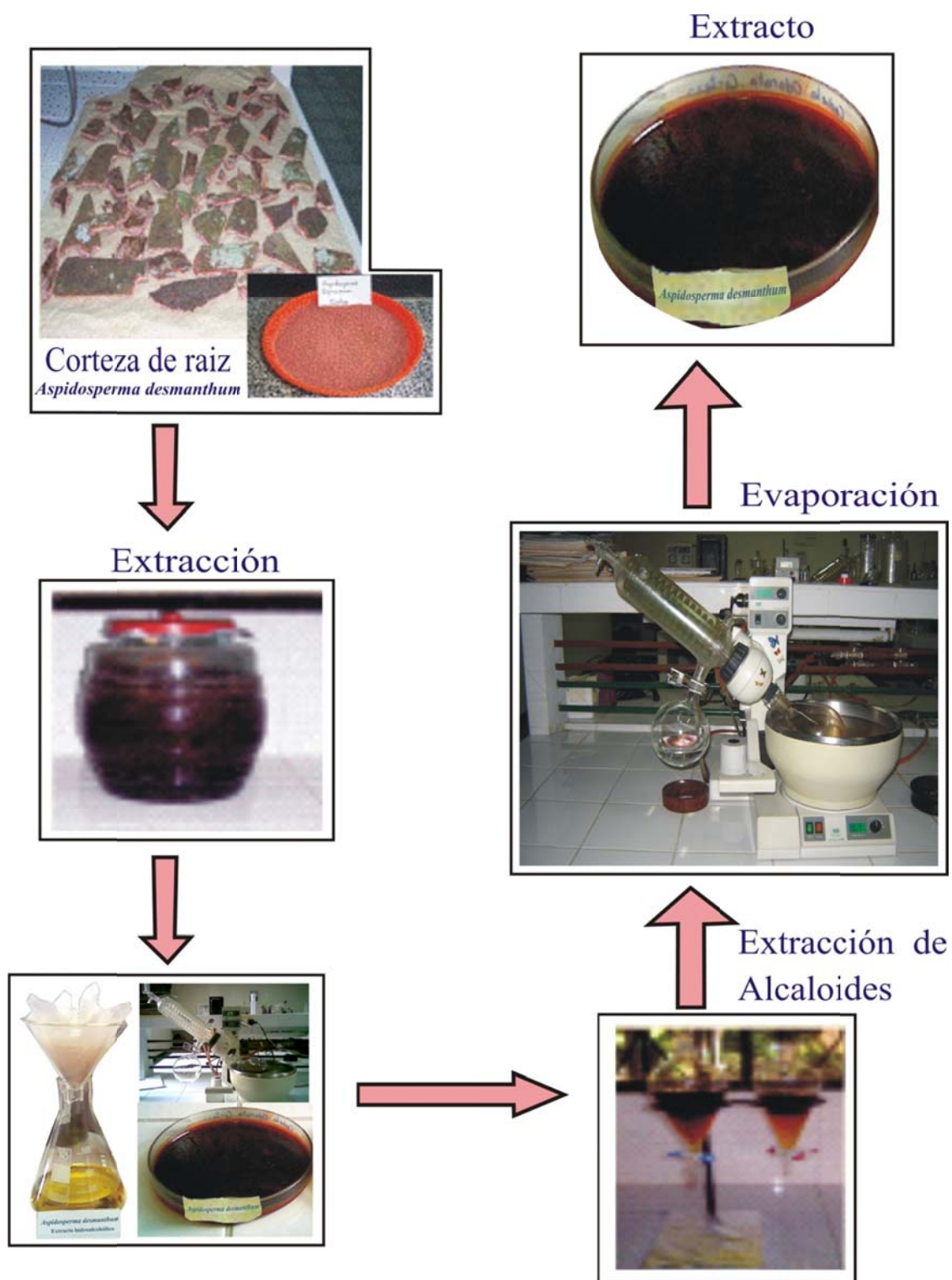


Figura 65. Obtención de extractos

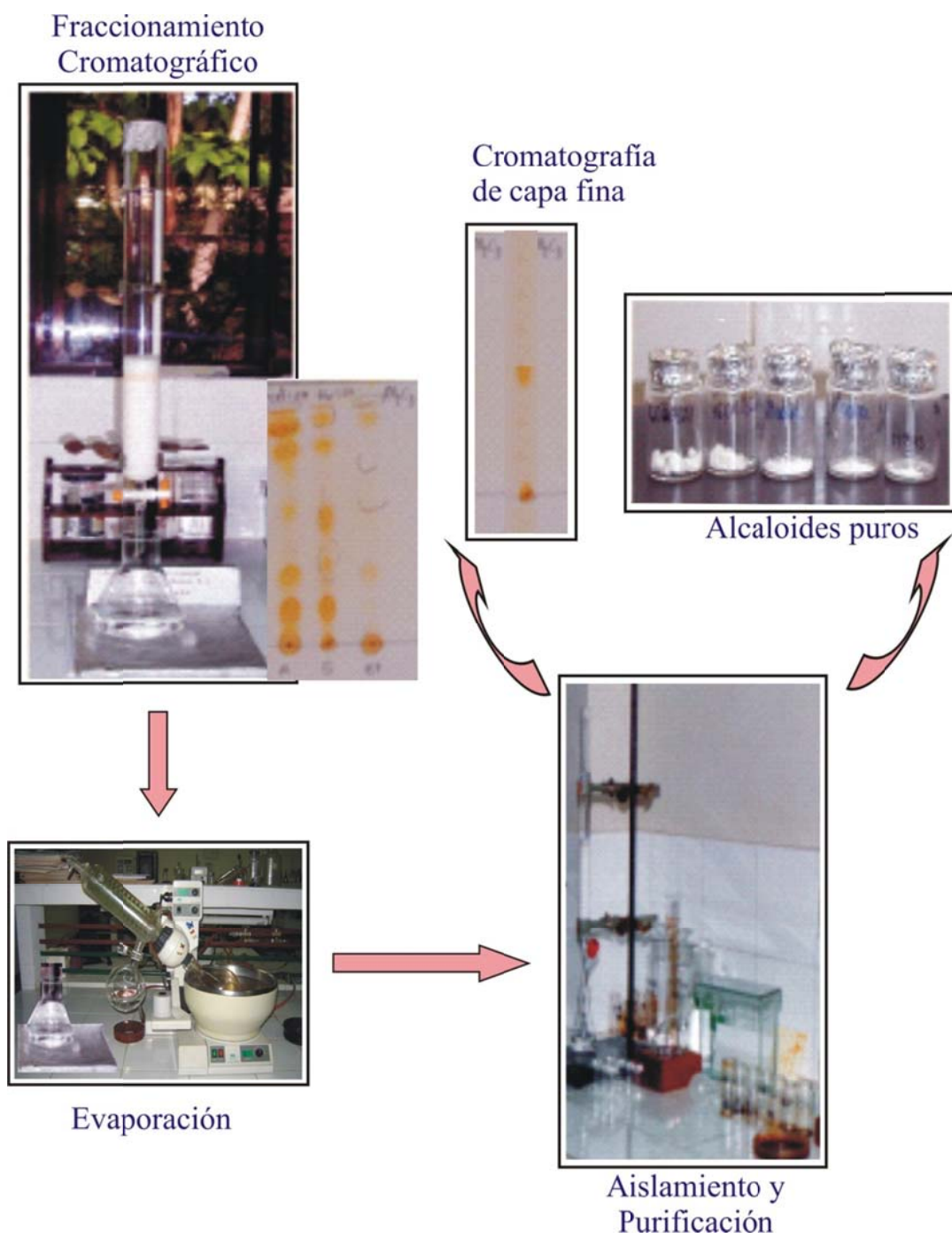


Fig. 66 Aislamiento y purificación de alcaloides

